

Aus dem Institut für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie  
(kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Dr. Dieter Bröring)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

**Untersuchung des Kandidatengens  
*CARD8/ TUCAN/ CARDINAL* beim  
sporadischen kolorektalen Karzinom**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**WITIGO VON SCHÖNFELS**  
aus Münster

Kiel 2010

Erster Berichterstatter: PD Dr. C. Schafmayer

Zweiter Berichterstatter: \_Prof. Dr. M. Stanulla

Tag der mündlichen Prüfung \_19.10.2010

Zum Druck genehmigt Kiel, 21.09.2010

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kolorektales Karzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.3	Erbliche Faktoren und familiäre Syndrome.....	4
1.1.4	Pathogenese.....	7
1.1.5	Klinik und Diagnostik.....	8
1.1.6	Therapie.....	8
1.2	Molekulargenetische Befunde des kolorektalen Karzinoms.....	9
1.3	Das Kandidatengen: CARD8/ TUCAN/ CARDINAL.....	11
1.4	Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen.....	13
1.4.1	Komplexe Erkrankungen.....	13
1.4.2	Kopplung und Assoziation.....	13
1.4.3	Fall-Kontroll-Studie.....	15
1.4.3.1	Odds (Chance).....	16
1.4.3.2	Odds Ratio (Chancenverhältnis).....	16
1.4.3.3	$\chi^2$ - Test.....	17
1.4.4	Positionsklonierung und Kandidatengene.....	17
1.4.5	Genetische Marker.....	17
1.4.6	Haplotyp- Blockstruktur und das HapMap- Projekt.....	19
1.5	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Patientenkollektiv.....	21
2.1.1	Einschlusskriterien.....	22
2.1.2	Rekrutierungsplattform (PopGen).....	22
2.2	Datenschutz und Ethik.....	23
2.3	Rekrutierung.....	24
2.4	Kontrollgruppe.....	24
2.5	Genotypisierung.....	25
2.5.1	DNA-Extraktion.....	25
2.5.2	Whole Genom Amplification (WGA).....	26
2.5.3	Genotypisierung mit dem SNPlex System.....	27
2.5.4	Auswahl der SNPs.....	28
2.6	Analyse.....	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Gesamtkollektiv.....	30
3.2	Power-Schätzung.....	31
3.3	Ergebnisse der SNP-Analysen.....	32
3.3.1	Durchführung der Assoziationstudie.....	32
3.3.2	Ergebnisse der Analyse.....	33
4	Diskussion.....	36
4.1	Familiäre Häufung des kolorektalen Karzinoms.....	36
4.2	Molekulargenetische Assoziationsstudie.....	37
4.3	Assoziation der Kandidatengene zum sporadischen KRK.....	38
4.4	Klinische Bedeutung/ Ausblick.....	39
5	Zusammenfassung.....	42
6	Literaturverzeichnis.....	43

7	Anhang .....	48
7.1	Fragebogen der Kolonkarzinompatienten .....	48
7.2	Einverständniserklärung und Merkblatt .....	56
7.3	Fragebogen der Kontrollgruppe .....	58
	Danksagung .....	64
	Curriculum Vitae .....	65

## Abkürzungsverzeichnis

<i>APC</i>	adenomatous-polyposis-coli
<i>ASO</i>	Allel-spezifisches-Oligonukleotid
<i>BER</i>	Base-Excision-Repair
<i>BMBF</i>	Bundesministerium für Bildung und Forschung
<i>C</i>	Cytosin
<i>CARD</i>	caspase-activating-recruitment-domain
<i>CARD8</i>	caspase-activating-recruitment-domain, member 8
<i>CARDINAL</i>	CARD inhibitor of NF-kappaB-activating ligands
<i>CD</i>	Crohn`s disease, Morbus Crohn
<i>CED</i>	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
<i>CEU</i>	Centre d`Étude du Polymorphisme Humain collection
<i>CU</i>	Colitis ulcerosa
<i>d</i>	per day, täglich
<i>dATP</i>	Desoxyadenosintriphosphat
<i>DCC</i>	deleted-in-colon-carcinoma, Tumorsuppressorgen
<i>DNA/DNS</i>	Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
<i>ED</i>	Erstdiagnose
<i>EDTA</i>	ethylene diamine tetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
<i>FAP</i>	familiäre adenomatöse Polyposis
<i>G</i>	Guanin
<i>HapMap</i>	Karte der häufigsten Haplotypen
<i>HNPCC</i>	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
<i>IBD</i>	Inflammatory bowel disease
<i>ICD-10</i>	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10. Revision

<i>K-ras</i>	Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene-homolog, Protoonkogen
KRK	Kolorektales Karzinom
LRR	leucine-rich repeat
LSO	Lokus-spezifisches Oligonukleotid
MAF	minor allele frequencies
mB	Megabasen
MDP	Muramyldipeptid
MMR	Mismatch-Repair (DNA-Reparatursystem)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NCBI	National Center for Biotechnology Information der National Library of Medicine und des National Institute of Health
NF-kB	Nuclear-factor kappa-B
NGFN	Nationales Genomforschungsnetz
NLRs	Nod-like receptors
OR	Odds Ratio
<i>p53</i>	<i>p53</i> -Tumorsuppressorgen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PopGen	Arbeitsgruppe zur Populationsgenetik
RCT	Radiochemotherapie
RR	relatives Risiko
SIR	standardised incidence ratios
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelbasenaustausch
tag SNP	tagging-SNP
<i>TUCAN</i>	tumor up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine
WGA	Whole-Genome-Amplification

# 1 Einleitung

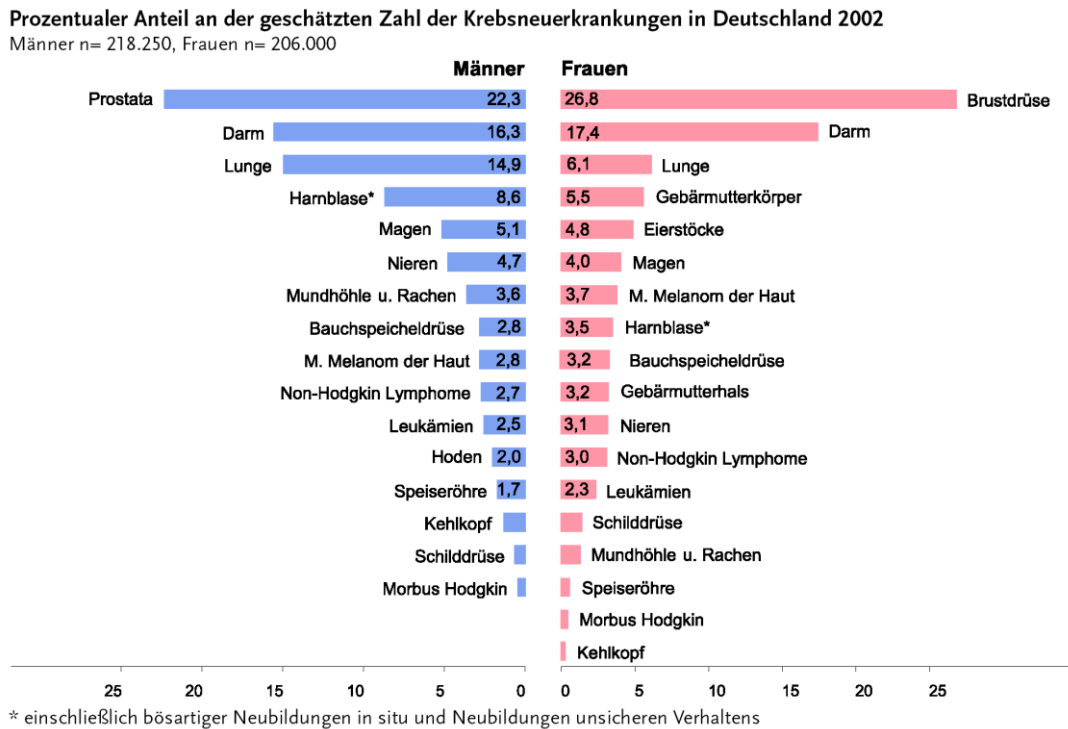
Traditionell hat sich die Untersuchung der Genetik des kolorektalen Karzinoms (KRK) auf monogene familiäre Syndrome, wie die familiäre adenomatöse Polyposis Coli und das hereditäre nicht polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) beschränkt. Doch ist die genetische Ätiopathogenese komplexer, denn nur 4-6% der Fälle können solchen monogenen Erkrankungen zugeordnet werden. Neben Umweltfaktoren und Ernährungsgewohnheiten scheinen genetische Faktoren auch eine Rolle in der Entstehung der sporadischen Fälle des kolorektalen Karzinoms zu spielen, wie es durch die ständige Beobachtung von familiär gehäuften Auftreten von KRK bewiesen wurde (Hemminki und Chen 2004). Das relative Geschwisterrisiko erstreckt sich von 1,2 in allen Fällen (Andrieu et al. 2003) bis 6,2 bei Indexpatienten, die jünger als 55 Jahre sind (Johns et al. 2002). Dennoch sind die Gene und Mutationen, die die Grundlage der familiären Häufung darstellen weitestgehend unbekannt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung des Kandidatengens *CARD8*, *CARDINAL* oder *TUCAN*. Es handelt sich hier um ein Gen der angeborenen Immunität, von dem vermutet wird, dass es mit dem sporadischen kolorektalen Karzinom assoziiert ist, da viele Krebserkrankungen auf dem Boden einer chronischen Entzündung entstehen.

## 1.1 *Kolorektales Karzinom*

### 1.1.1 *Epidemiologie*

Das kolorektale Karzinom ist, wie in Abbildung 1 dargestellt, in Deutschland sowohl für Männer als auch für Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung. Etwas über 35.000 Männer und Frauen erkranken jedes Jahr neu. Von diesen sind 10% jünger als 40 Jahre, obwohl es sich um eine Erkrankung des älteren Menschen handelt, da ab dem 50. Lebensjahr die Erkrankungswahrscheinlichkeit steil ansteigt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 69 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren (RKI 2006). Im Jahre 2006 machte das kolorektale Karzinom 12,9% der Krebserkrankungen in Europa aus, was eine Summe von 412.900 Fällen bedeutet (Ferlay et al. 2007). In Nordamerika gab es im Jahre 2006 183.482 Neuerkrankungen. Weltweit traten im gleichen Jahr 1.023.256 neue Fälle auf, damit ist das kolorektale Karzinom weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung (Kamangar et al. 2006).

Abbildung 1: prozentualer Anteil an der geschätzten Anzahl der Krebsneuerkrankungen (RKI 2006)



Circa 29.000 Menschen sterben in Deutschland jährlich am kolorektalen Karzinom. Das sind 40 % der Neuerkrankten, womit das kolorektale Karzinom auch die zweithäufigste Todesursache für beide Geschlechter ist. Das sind im europäischen Vergleich die höchsten Werte für Frauen und die vierthöchsten Werte für Männer.

Bei Männern stieg die Mortalitätsrate in den Jahren 1980 bis 1995 um circa 15 Prozent. Damit übersteigt die Mortalitätsrate in Deutschland das derzeitige Mittel aller europäischen Länder (Engel et al. 2000). Die geschätzten Erkrankungsrate von Männern und Frauen bleiben, nach einem zunehmenden Trend in den letzten Jahrzehnten, auf unterschiedlichem Niveau in etwa konstant. Im Kontrast zur Entwicklung der Inzidenz nehmen die Sterberaten für beide Geschlechter seit Mitte der 1970er Jahre stetig ab (RKI 2006).

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Ähnlich wie bei den anderen Krebserkrankungen spielen auch beim Dickdarmkrebs sowohl exogene als auch endogene Faktoren bei der Krankheitsentstehung eine



Rolle. Es konnten Risikofaktoren identifiziert werden, deren Zusammenspiel zur Krebserkrankung führen können. Dennoch ist die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms noch nicht vollständig geklärt.

Viele Hypothesen sind dem Zusammenhang zwischen dem westlichen Lebensstil und dem Auftreten des kolorektalen Karzinoms entsprungen. Dabei steht die westliche Ernährung im Vordergrund. In verschiedenen Studien, die in unterschiedlichen Ländern durchgeführt wurden, konnte ein Zusammenhang zwischen dem Pro-Kopf-Verzehr von tierischen Fetten und „rotem“ und veredeltem Fleisch und der steigenden Inzidenz gezeigt werden (Franco et al. 2005). Nahrungsfette führen zu einer erhöhten Produktion von primären Gallensäuren, welche eine Rolle bei der Fettabsorption im Dünndarm spielen. Obwohl ein Großteil dieser Gallensäure sehr effizient im Ileum reabsorbiert wird, gelangen 1-2% in das Colon, wo sie von der physiologischen Darmflora zu sekundären und tertiären Gallensäuren umgewandelt werden. Diese Produkte können zur Tumorentstehung beitragen, indem sie zu Karzinogenen umgebaut werden oder wiederum den Anteil von Anaerobiern im Darm erhöhen.

Weiterhin konnte Denis Burkitt in den 70er Jahren besonders niedrige Inzidenzen bei einem afrikanischen Stamm feststellen, dessen Nahrung besonders ballaststoffreich ist. Daraus entstand die Hypothese, dass ballaststoffarme Ernährung als Risikofaktor angesehen werden kann (Burkitt 1993). Demnach wird durch ballaststoff- und faserreiche Kost vermutlich die fäkale Konzentration von Karzinogenen und Gallensäuren verdünnt und eine schnellere Passage des Stuhls durch den Darm hervorgerufen. Dadurch wiederum kommt es zu einer kürzeren Kontaktzeit zwischen Darmmukosa und Karzinogenen (American\_Gastroenterological\_Association 2000). Laut einer Studie von Bingham et al. würde in Populationen, die nur geringe Mengen Ballaststoffe zu sich nehmen, durch eine Verdopplung der Aufnahme das Karzinomsrisiko um 40% reduziert werden (Bingham et al. 2003).

Auch der regelmäßige Konsum von Tabak und Alkohol trägt zu der Entstehung bei. So gilt insbesondere das Rauchen über lange Zeit in einer hohen Dosis als ein Risikofaktor für Darmkrebs. Hiervon sind Frauen stärker betroffen als Männer. Gleichzeitig führt eine Beendigung starken Rauchens zu einer Reduktion des Risikos an Darmkrebs zu erkranken (Verla-Tebit et al. 2006). Epidemiologische Studien zeigten ebenfalls eine Wechselbeziehung des Alkoholkonsums von 30 g/d oder mehr, mit einer erhöhten Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (Cho et al. 2004).

Auch chronische Entzündungen führen zu einer Erhöhung des relativen Risikos (Balkwill und Mantovani 2001). Neben diesen Faktoren spielt die familiäre Disposition eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms (Hemminki und Chen 2004).

### **1.1.3 Erbliche Faktoren und familiäre Syndrome**

In der Regel unterscheidet man beim kolorektalen Karzinom die familiäre von der sporadischen Form. Beide stellen zusammen eine komplexe Erkrankung dar, die wahrscheinlich aufgrund von Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel den oben genannten Risikofaktoren, und einer genetischen Prädisposition entsteht (Lynch und Lynch 1998). So stellen auch Krebsfälle in der Familie des eines Patienten ein erhöhtes Risiko an KRK zu erkranken dar.

In einigen Fällen sind dies bekannte familiäre Syndrome, zum größten Teil handelt es sich jedoch um sporadische Karzinomfälle mit positiver Familienanamnese (Cruz-Bustillo Clarens 2004). Für die bereits bekannten Syndrome wurde 1998 von den Autoren Lynch und Lynch folgende komplette Klassifikation aufgestellt:

- Hereditary non-polyposis colorectal cancer ( HNPCC)
- Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli (FAP)
- Abgemilderte FAP (AFAP, engl.: attenuated FAP)
- I1307K Mutation bei aschkenasischen Juden
- Juvenile Polyposis Coli
- Peutz-Jeghers Syndrom

Die große Mehrheit der erblichen Kolonkarzinomfälle sind HNPCC bedingt. Dabei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Veranlagung für Dickdarmkrebs, der zu 70% im proximalen Colon vorkommt (Lynch und Lynch 1998). Die betroffenen Personen entwickeln im Gegensatz zu FAP-Patienten nur wenige Polypen, die sich aber sehr leicht zu einem malignen Karzinom weiterentwickeln. Der Grund dafür ist die der Erkrankung zugrunde liegende Mutation in den Mismatch Repair Genen (MMR), *hMSH2* auf Chromosom 2p, *hMLH1* auf Chromosom 3p und weiteren, über die nur in einigen Fällen berichtet wurden. Mutationen in diesen Genen werden als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet (Calvert und Frucht 2002). Im Jahre 1991 wurden die Amsterdam Kriterien etabliert, um die klinische Diagnose HNPCC zu bestätigen (Vasen et al. 1991). Weil diese sich als sehr eingeschränkt

erwiesen, wurden 1997 die Bethesda Kriterien (Rodriguez-Bigas et al. 1997) und die Amsterdam Kriterien II entwickelt.

Obwohl die FAP nur eine Minderheit der erblichen KRK ausmacht ( $\approx 1\%$ ), ist das Syndrom ein gutes Modell für die erbliche Veranlagung zu Krebs (Lynch und Lynch 1998). Die FAP hat ein typisches klinisches Erscheinungsbild mit üppigen Polypen, wobei sie als mild bezeichnet wird, wenn weniger als 1000 Polypen auftreten, und als schwer, wenn es mehr sind. Es ist eine autosomal dominante Erkrankung, die sich typischerweise bereits in jungem Alter (39 Jahre) mit einem kolorektalen Karzinom manifestiert (Lynch und Lynch 1998). Die FAP tritt bei Patienten mit einer Keimbahnmutation im APC-Gen auf 5q21 auf (Cruz-Bustillo Clarens 2004). Andere klinische Charakterisierungsmerkmale sind Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels (CHRPE), Kieferzysten, Talgzysten und Osteome (Cruz-Bustillo Clarens 2004). Je nach den Begleiterscheinungen werden auch die Varianten der FAP bezeichnet, wie z.B. das Gardner Syndrom (Fearnhead et al. 2001). Beim Turcot Syndrom handelt es sich um das gemeinsame Auftreten von Adenomen und Hirntumoren, sowohl bei FAP als auch bei HNPCC (Hamilton et al. 1995). Auch bei der I1307K Mutation, die besonders bei aschkenasischen Juden beschrieben ist, handelt es sich um eine Mutation im APC-Gen (Locker et al. 2006). In diesem Fall codiert allerdings auch das mutierte Gen für ein voll funktionierendes APC Gen (Laken et al. 1997). Weil diese Tatsache das erhöhte Risiko für KRK nicht erklärt und auch das Manifestationsalter nicht genau bekannt ist, kann noch keine abschließende Erklärung für die erhöhte Inzidenz für KRK in aschkenasischen Juden gegeben werden. Eine mögliche Theorie ist, dass diese Mutation anfälliger für weitere Mutationen macht (Locker et al. 2006). Die familiäre Juvenile Polyposis Coli (FJP), die auf einer Mutation in einem Tyrosin Phosphat Gen beruht (Burt 2000), bringt ebenfalls eine größere Gefahr mit sich an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, obwohl juvenile Kolonpolypen an sich kein ungewöhnlicher Befund sind (Lynch und Lynch 1998). Das Peutz-Jeghers Syndrom ist charakterisiert durch hamartöse Polypen im Magen, Dünndarm und im Colon. Des Weiteren gehören periorale mukokutanöse Melaninpigmentierungen zum Syndromkomplex (Cruz-Bustillo Clarens 2004). Die der Erkrankung zugrunde liegende Mutation tritt in einem für eine Serin-Threonin-Kinase (STK11) codierenden Gen auf dem Chromosom 19p13.3 auf (Jenne et al. 1998).

Dennoch sind weniger als 5% der Kolonkarzinomfälle auf diese bekannten Syndrome zurückzuführen (Potter 1999), obwohl laut Studien auch ein Drittel der sporadischen Karzinomfälle eine positive Familienanamnese ausweisen (Lichtenstein et al. 2000; Kemp et al. 2004; Davidson 2007). Es scheint auch im Großteil der anderen Fälle einen erblichen Hintergrund zu geben, da mindestens 9 retrospektive Studien gezeigt haben (Tabelle 1), dass ein Fall eines kolorektalen Karzinoms bei einem Verwandten 1. Grades (Elternteil oder Geschwister) das persönliche Erkrankungsrisiko um 1,8 bis 7,5 erhöht. Diese Studien sind verschiedenster Natur. Retrospektive Studien wie die von Ponz de Leon et al. beschreiben aufgrund von Archivdaten ein relatives Risiko von bis zu 7,5, das bei Zwillingen sogar auf 14,7 ansteigt. Auch in großen prospektiven Studien, wie in der von Fuchs et al., konnte ein hohes RR gezeigt werden (Maire et al. 1984; Ponz de Leon et al. 1987; Bonelli et al. 1988; Fisher und Armstrong 1989; Kune et al. 1989; Sondergaard et al. 1991; Stephenson et al. 1991; St John et al. 1993; Fuchs et al. 1994).

Tabelle 1: Liste der Studien zum familiären Risiko eines KRK

Autoren	Kohortengröße n	RR	CI
Maire et al., 1984	170	6,3	n/a
Ponz de Leon et al., 1987	389	7,5	n/a
Bonelli et al., 1988	697	2,36	2.06-4.89
Fischer und Armstrong, 1989	189	2,5	0.8 - 8.0
Kune et al., 1989	702	2,13	1.53-2.96
Sondergaard et al., 1991	1524	1,62-1,87	1.54-2.27
Stephenson et al., 1991	100	4,6	n/a
St John et al., 1993	523	1,8-5,7	1.7 to 19.3
Fuchs et al., 1994	119116	1,72-5,37	1.98 to 14.6

Die Erhöhung des relativen Risikos durch Verwandte ersten Grades mit kolorektalen Karzinom konnte durch zwei prospektive Studien bestätigt werden (Fuchs et al. 1994; Narod et al. 1995). In einer Studie, die sich nur auf Hochrisiko-Familien beschränkt hat, konnte sogar eine Erblichkeit von einigen Syndromen bewiesen werden (Andrieu et al. 2003).

Dies lässt auf eine erbliche Komponente bei der Entstehung der Krankheit schließen, die außerhalb der bekannten familiären Syndrome liegt, und gibt Anlass dazu, nach weiteren Genen außerhalb der bekannten Syndrome zu fahnden.

### **1.1.4 Pathogenese**

Die Grundlage der Karzinomentstehung ist die so genannte Adenom-Karzinom-Sequenz. Es handelt sich also um Adenokarzinome, die über den Weg der gutartigen Veränderung eines Adenoms entstehen (Fearon und Vogelstein 1990). Diese allgemein akzeptierte molekulargenetische Pathogenese wurde in zahlreichen Studien bestätigt (Vogelstein B 2002; Michor et al. 2005). In der Karzinogenese akkumulieren mehrere Ereignisse. Durch eine Aktivierung von Onkogenen und dem Verlust von funktionierenden Tumorsuppressorgenen entsteht ein uneingeschränkt wachsendes Gewebe, aus dem im Endeffekt ein Karzinom werden kann. Der tumorinitiierende Schritt wird durch die Inaktivierung eines Tumorsuppressors, dem APC- Gen, ausgelöst (Powell et al. 1992). Das APC- Gen steht hierbei für das adenomatöse polyposis Coli Gen, welches bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) durch eine Keimbahnmutation die Grundlage der Erkrankung bildet. In etwa 85 % der kolorektalen Karzinome ist eine Veränderung in diesem Pfad zu beobachten (Michor et al. 2004). Das APC- Genprodukt ist vermutlich an der Zelladhäsion und Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt, da eine Verbindung zu Adhäsionsproteinen, wie dem Catenin nachgewiesen werden konnte (Su et al. 1993; Cruz-Bustillo Clarens 2004). Die weitere Tumorprogression geschieht durch Mutationen im K-ras- Gen, einem Protoonkogen, welches in 70 % aller KRK verändert ist (Michor et al. 2005). Das mutierte K-ras- Protein sendet dauerhaft Wachstumssignale an die Zelle, woraus das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen resultiert. Im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung kommt es zum Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie dem DCC-Gen („Deleted in colon carcinoma“) und dem p53- Gen. DCC- Mutationen führen zum Verlust des Zellzusammenhalts, welche bei 70 % der KRK und 50% der fortgeschrittenen Adenome auftreten (Calvert und Frucht 2002). Das Genprodukt von p53 ist ein wichtiges Regulatormolekül und wird als Wächter des Genoms bezeichnet. Es verhindert die Replikation geschädigter DNA und regt die Apoptose von geschädigten Zellen an. Die Inaktivierung von p53 führt also zu einem Ausbleiben des programmierten Zelltods und damit zu einem ungebremsten Wachstum der Tumorzellen. Mutationen dieses Gens stellen mit 90% die häufigste Veränderung bei Krebserkrankungen dar (Michor et al. 2005).

Trotz der Feststellung, dass in allen kolorektalen Karzinomen eine Ansammlung von verschiedenen Mutationen der oben genannten Gene besteht, kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle KRK die gleichen Mutationen, sowohl qualitativ, als auch quantitativ erfahren. Möglicherweise unterstützen unbekannte Keimbahnmutationen, zum Beispiel das in dieser Arbeit untersuchte *CARD8*-Gen, diese beschriebenen Krebsentstehungsmechanismen.

### **1.1.5 Klinik und Diagnostik**

Die Klinik des kolorektalen Karzinoms ist weitgehend unspezifisch. Es gibt keine zuverlässigen Frühsymptome. Es kann zu Blutbeimengungen kommen, die besonders häufig bei Rektumkarzinomen auftreten und die leicht mit Hämorrhoiden verwechselt werden können. Auch jede neu aufgetretene Veränderung der Stuhlgewohnheiten ist auf kolorektales Karzinom zu untersuchen. Die häufigsten Symptome sind die klassische B-Symptomatik wie Gewichtsverlust oder Abgeschlagenheit und Zeichen einer Anämie infolge einer chronischen Blutung.

Am besten kann man Karzinome bei einer Darmspiegelung im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung erkennen. Dabei kann man auch die oben genannte Adenom-Karzinom-Sequenz unterbrechen, indem man noch gutartige Polypen entfernt.

Das Krebsfrüherkennungsprogramm hinsichtlich der Früherkennung von Darmkrebs wurde zum 1. Oktober 2002 erweitert. Seitdem können gesetzlich krankenversicherte Personen im Alter von 50–54 Jahren jährlich einen Test auf verstecktes Blut im Stuhl (Hämokkult) durchführen lassen und haben ab dem Alter von 55 Jahren Anspruch auf die Durchführung einer Früherkennungsdarmspiegelung, einschließlich einer Wiederholungskoloskopie nach 10 Jahren. Versicherte, die sich gegen eine Früherkennungskoloskopie entscheiden, können alternativ ab vollendetem 55. Lebensjahr einen Okkultblut-Test in zweijährlichem Turnus fortführen.

### **1.1.6 Therapie**

Die Therapie kolorektaler Karzinome sollte grundsätzlich auf der Basis einer histologischen Untersuchung geplant werden. Als Karzinome gelten Veränderungen, bei denen atypische epitheliale Veränderungen in die Submukosa infiltrieren (pT1 oder mehr). Weiterhin ist die Therapie abhängig von der Lage des Karzinoms, das in mehr als zwei Drittel der Fälle im Rektum oder Sigma lokalisiert ist. Kolorektale

Karzinome wachsen vorwiegend zirkulär und metastasieren weitgehend konstant in die regionären Lymphknoten. Unter dem Gesichtspunkt des intramuralen Wachstums wäre eine Darmresektion mit einem Sicherheitsabstand von 2 cm ausreichend. Das tatsächliche Ausmaß der Darmresektion wird aber durch die Resektion der versorgenden Gefäße und das hierdurch definierte Lymphabflussgebiet vorgegeben. Dadurch ergeben sich je nach Tumorage verschiedene Operationsansätze, mit denen man den Tumor und das drainierende Lymphgebiet entfernt. Des Weiteren ist ab UICC-Stadium III eine adjuvante Chemotherapie mit einem 5-FU/Folinsäurehaltigen Protokoll indiziert (Schmiegel et al. 2004).

## ***1.2 Molekulargenetische Befunde des kolorektalen Karzinoms***

Um die ätiologischen Mechanismen der Krebsentstehung zu verstehen und präventiv tätig werden zu können, ist die Suche nach den Gründen der familiären Häufung von Krebs essentiell wichtig (Hemminki und Chen 2004). Dennoch ist eine genaue Differenzierung zwischen genetischen und exogenen Einflussfaktoren auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms praktisch nicht möglich. Es scheint eher ein fließender Übergang im gesamten Spektrum der Ursachen zu sein, die zur Entstehung des sporadischen KRK beisteuern. Wahrscheinlich entsteht die Erkrankung auf der Grundlage mehrerer mäßig durchsetzungsfähiger Gene (low-penetrance genes) oder Genvarianten, die den Körper anfällig für aggressive exogene Faktoren machen. Gene, die für diesen Prozess in Frage kämen wären solche, die am Stoffwechsel oder an der Methylierung der DNA beteiligt sind, oder die die Mikroumgebung des Darms aufrechterhalten. Weiterhin sind Onkogene, also Gene deren Überexpression zu Krebsentwicklung führen kann, Tumorsuppressorgene, deren Minderexpression in einer malignen Entartung resultieren kann, und auch solche, die an der Immunabwehr teilhaben, beteiligt. Auch niedrig penetrante Varianten von sogenannten high-penetrance-genes, wie Gene für DNA- Reparaturmechanismen, könnten eine wichtige Rolle bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms spielen. Die individuelle Kapazität dieser Mechanismen scheint einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber dem KRK zu haben. Mittlerweile konnten verschiedene Polymorphismen für DNA- Reparaturgene in zahlreichen Studien identifiziert werden.

So konnten Lipkin et al. 2004 anhand von 455 israelischen Patienten eine Assoziation zwischen der Variante 415 G → C des Mismatch- Repair- Gens *MLH1* und dem KRK, die für 1,3 % der sporadischen israelischen KRK Fälle sorgt, feststellen (Lipkin et al. 2004).

Anhand von 2239 Fällen zeigten Farrington et al. 2005 in der Klasse der DNS-Reparaturmechanismen ebenfalls eine Assoziation des Basen- Exzision- Reparatur Gens (*BER*) *MUTYH* mit dem KRK. Biallelische *MUTYH* Defekte gehen mit einem dreißigfach erhöhten Risiko einher und sorgen für 0,8% der Erkrankungen der unter 55 Jahre alten Patienten (Farrington et al. 2005).

Auch Naccarati et al. untersuchten und evaluierten 2007 25 Assoziationstudien, die sich mit einigen Polymorphismen in DNS- Reparaturmechanismen befasst haben, um einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA- Reparaturpolymorphismen und dem Risiko für ein kolorektales Karzinom darstellen zu können. In dem Review konnten keine relevanten Zusammenhänge gefunden werden. Es zeigte sich jedoch ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko für ein KRK bei den Polymorphismen der Gene *XRCC1* und *XPB*. Trotzdem bleibt ihre genaue funktionelle Einflussnahme unvollständig verstanden (Naccarati et al. 2007).

Weitere Metaanalysen haben sich mit den niedrigpenetranten Genen, den sogenannten low-penetrance-genes, beschäftigt und konnten auch hier einige Polymorphismen feststellen, die mit dem Risiko am KRK zu erkranken, in Zusammenhang stehen.

Houlston und Tomlinson konnten 2001 in einer Metaanalyse von 50 Studien eine Erhöhung des relativen Risikos an KRK zu erkranken bei folgenden Polymorphismen feststellen: *APC-I1307K*, *HRAS1-VNTR*, *MTHFR* (Houlston und Tomlinson 2001).

De Jong et al. konnten 2002 in einer weiteren Metaanalyse anhand von Studien über 30 Polymorphismen folgende Assoziation feststellen: *HRAS1-VNTR*, *GSTT1*, *ALDH2*, *NAT2* (Phänotyp), TNFα (α2) gehen mit einem erhöhten KRK Risiko einher. *MTHFR*, Tp53 (Intron 3), TNFα (α5, α13) gehen mit einem erniedrigten Risiko für KRK einher (de Jong et al. 2002).

2007 konnten Tomlinson et al. durch einen genomweiten Scan anhand von 930 Patienten den SNP, rs6983267, auf Chromosomen 8q24.21 finden. Da dieser Locus sowohl das KRK- als auch das Adenom Risiko erhöht, liegt wahrscheinlich eine Tumorentstehung vor. In ca. 20 % aller KRK liegt eine Mutation auf diesem Locus vor. Dementsprechend hat dieser SNP mit der Interaktion anderer low-penetrance-genes



einen substantiellen Effekt auf das KRK Risiko (Tomlinson et al. 2007). Haiman et al. konnten das Ergebnis anhand von 1807 Patienten bestätigen (Haiman et al. 2007).

### **1.3 Das Kandidatengen: *CARD8/ TUCAN/ CARDINAL***

Die Entstehung von Karzinomen beruht im Wesentlichen auf einem Missverhältnis von karzinogenen und protektiven Faktoren. Ein wichtiger schützender Faktor ist der Mechanismus der Apoptose, also der „Selbstmord“ der Zelle. Bei der Apoptose gibt es zwei verschiedene Wege der Initiation, der TNF und der FAS aktivierte Weg (Wajant 2002). Über ein Gleichgewicht von Proteinen der Bcl-2-Familie wird die Apoptose reguliert, dabei stehen sich proapoptotische Proteine, wie BAX oder Apaf-1 und antiapoptotische wie Bcl-2 gegenüber. Die Apoptose wird bei einem Überwiegen der proapoptotischen Proteine durch Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien eingeleitet, was dann eine Enzymkaskade, die aus Caspasen besteht, in Gang setzt. Störungen dieses Prozesses können durch die mangelnde Wachstumskontrolle zu Krebs führen.

Auch bei Entzündungen stehen sich protektive und karzinogene Faktoren gegenüber. Schon Rudolf Virchow machte 1863 die Entdeckung, dass Leukozyten in neoplastischem Gewebe eine Verbindung von Entzündung und Krebs darstellen (Balkwill und Mantovani 2001). 15% der bösartigen Erkrankungen weltweit werden heutzutage mit chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht. (Coussens und Werb 2002). Die bekanntesten Beispiele sind wahrscheinlich das Cervixkarzinom auf dem Boden einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) (zur Hausen 2002) und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) in Folge einer chronischen Hepatitis (Gomaa et al. 2008). Daher ist die These Virchows, dass das lymphozytäre Infiltrat Ausdruck einer chronischen Entzündung ist, die das Zellwachstum fördert, weithin akzeptiert und in vielen Studien bestätigt (Balkwill und Mantovani 2001; Coussens und Werb 2002; Itzkowitz und Yio 2004; Macarthur et al. 2004; Karin und Greten 2005). Dabei ist es wichtig die Pathophysiologie einer Entzündung, die eigentlich selbstlimitierend verläuft, zu verstehen. Ist der regulatorische Mechanismus von inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen gestört, entwickelt sich der selbsterhaltende Prozess einer chronischen Entzündung (Coussens und Werb 2002).

Durch das ständige Einwirken von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, die zur Bekämpfung der Infektion ausgeschüttet werden, wird aber auch die körpereigene

DNA geschädigt. Diese Schädigung äußert sich vor allem in Punktmutationen, Deletionen oder Umordnungen.

Des Weiteren werden die Reparatur- und Apoptoseprogramme der Zelle geschädigt, die daraufhin ungehemmt wachsen kann. Es entsteht also eine Zelle, die mit einer geschädigten DNA uneingeschränkt proliferieren kann, die außerdem durch die entzündungsbedingte Angiogenese und verbesserte Durchblutung perfekte Voraussetzungen für ihr Wachstum vorfindet (Coussens und Werb 2002).

Ein Gen, das in besonderem Maße sowohl auf die Entzündung als auch auf die Apoptose wirkt, ist *CARD8*, *TUCAN* oder auch *CARDINAL* genannt.

Dieses Protein, das aus der *CARD*-Familie stammt, wirkt auf verschiedene Arten auf die Apoptose. Zum einen hemmt es kompetitiv die Aktivierung der Caspasenkaskade durch Apaf-1 durch Bindung an Procaspase 9, die zu den Initiatorcaspasen gehört, zum anderen hemmt es den durch BAX initiierten Weg zur Apoptose. Zellen, die *CARD8* überexprimieren, sind resistenter für einen Weg zur Apoptose (Pathan et al. 2001).

*CARD8* modifiziert auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB, so dass er weniger aktiv ist (Bouchier-Hayes und Martin 2004). Dieser ist wichtig für die Exprimierung zahlreicher Gene, die die angeborene und adaptive Immunantwort regulieren. Durch die Aktivierung von NFκB werden zahlreiche Zytokine, Adhäsionsmoleküle, akute Phase Enzyme, induzierbare Effektorenzyme sowie verschiedene Regulatoren für die Apoptose und das Zellwachstum verstärkt exprimiert (Ghosh und Karin 2002). Dieses Enzymsystem kann also eine Apoptose-resistente Zelle mit einem Milieu versorgen, das sie zum Wachstum anreizt und durch verstärkte Angiogenese mit den Nährstoffen versorgt.

Dieses Gen, das so stark in Mechanismen eingreift, die mit der Krebsentwicklung in Zusammenhang stehen, soll in dieser Arbeit, im Rahmen einer Kandidatengenstudie im Hinblick auf ein erhöhtes Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, überprüft werden.

## **1.4 Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen**

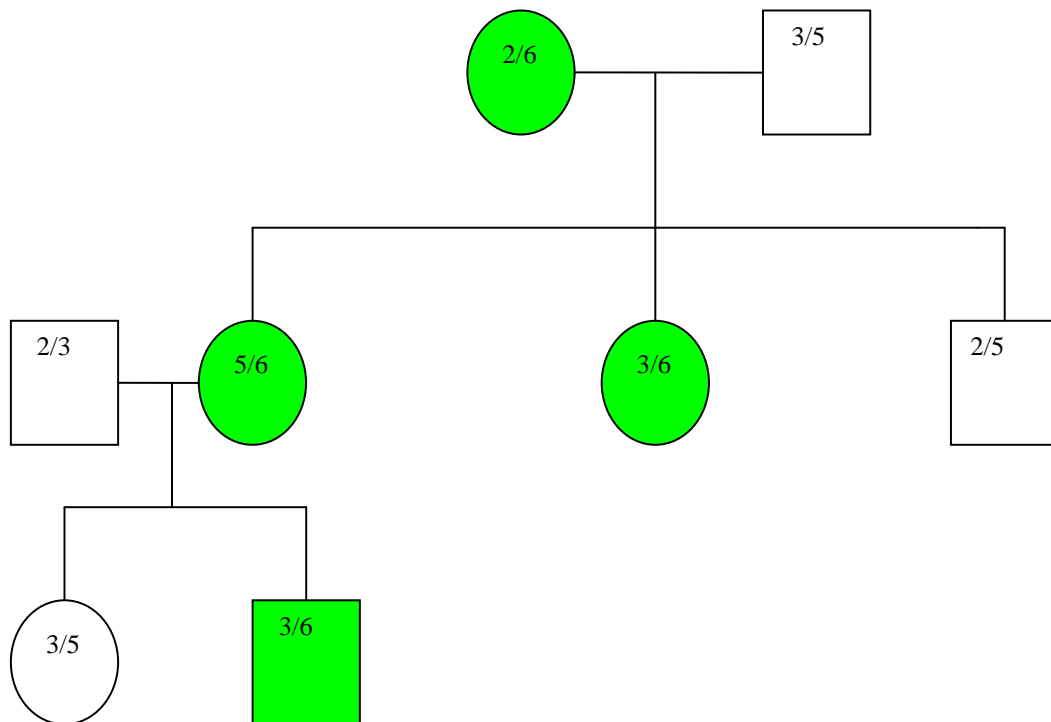
### **1.4.1 Komplexe Erkrankungen**

Krankheiten, bei denen auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Entstehung spielen, werden in klassische mendelsche und komplexe Erkrankungen unterteilt, wobei die klassischen den Mendelschen Gesetzen folgen, es also eine klare Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp gibt. Typische Beispiele stellen die zystische Fibrose und die Neurofibromatose dar. Anders ist es bei den komplexen Erkrankungen, bei denen die polygene Vererbung im Vordergrund steht und somit kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp ersichtlich ist. Hier existiert keine Variante nur eines einzigen Gens, die zu der Entstehung einer Erkrankung führt, sondern mehrere interagierende Gene, die auch einer starken Beeinflussung durch die Umwelt unterliegen (Ziegler 2002). Während monogene Erkrankungen relativ selten auftreten, folgen die meisten häufigen Erkrankungen einem komplexen Erbgang (Lander und Schork 1994; Chakravarti 1999; Nothnagel und Rohde 2005). Dazu zählen unter anderem das Gallensteinleiden (Buch et al. 2007), Morbus Alzheimer (Corder et al. 1993; Roses 1997) Diabetes Mellitus Typ 2 (Horikawa et al. 2000) und Morbus Crohn (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001). Bei solchen multigenetischen Erbgängen reichen die Mendelschen Gesetze zur Erklärung nicht mehr aus.

### **1.4.2 Kopplung und Assoziation**

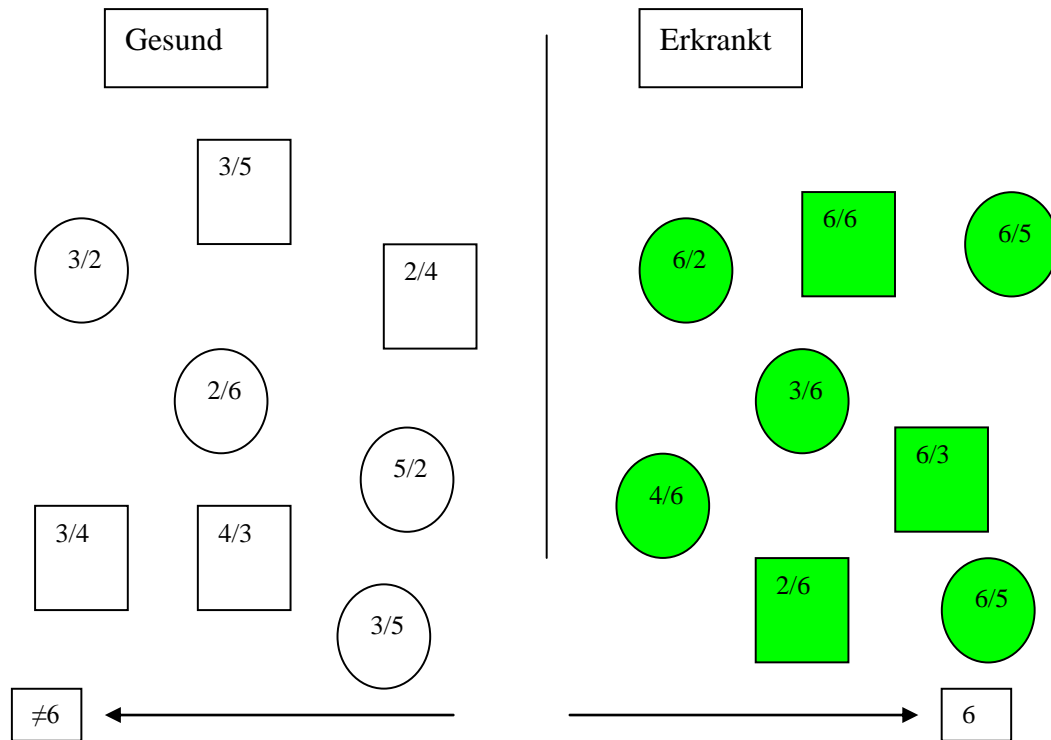
Bei der Erforschung von Genen, die mit bestimmten Krankheiten in Verbindung stehen, ist eine Identifikation und eine Lokalisation der chromosomalen Region, die mit der Krankheitsentstehung in Verbindung steht, unumgänglich. Dabei bedient man sich bei monogenen Erkrankungen der familiären Kopplungsanalyse, bei der die gemeinsame Vererbung von Krankheitsmerkmalen und genetischen Markern überprüft wird (Ott 1974). Dem liegt die Tatsache zugrunde, dass eine bestimmte DNA-Sequenz und ein Marker bei der meiotischen Zellteilung mit einer umso geringeren Wahrscheinlichkeit voneinander getrennt werden, je näher sie aneinander liegen. Da die Kopplungsanalyse für die Ortsfindung der Krankheitsmerkmale immer nur eine Generation nutzt (z.B. betroffene Geschwisterpaare), ist dieses Verfahren zur Identifizierung der gesuchten Gene komplexer Erkrankungen sehr zeit- und kostenintensiv (Ziegler 2002) (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Das Prinzip der genetischen Kopplung: Innerhalb einer Familie wird eine autosomal dominante Erkrankung (grüne Füllfarbe) immer mit dem Allel 6 weitergegeben.



Auch mit Hilfe von Assoziationsstudien können mögliche Krankheitsgene komplexer Erkrankungen gefunden werden. Dabei bedient man sich der Tatsache, dass ein spezifisches Allel eines genetischen Markers häufiger bei erkrankten Personen als bei einer gesunden Kontrollpopulation vorkommt. Dies bezeichnet man als Assoziation. Hierbei werden keine Familien mit einer Krankheitshäufung benötigt. Vielmehr handelt es sich um eine populationsbasierte Studie mit Fall- Kontroll Charakter (Ziegler 2002). Durch die Analyse auf Populationsebene werden die Rekombinationsereignisse mehrerer hundert Generationen erfasst.

Abbildung 3: Das Prinzip der genetischen Assoziation: Das krankheitsverursachende Allel 6 ist häufiger bei den erkrankten Personen (grüne Füllfarbe) nachzuweisen. Bei den gesunden Probanden ist das Allel 6 selten.



### 1.4.3 Fall-Kontroll-Studie

Um eine Assoziation zwischen Krankheiten und Kandidatengenen zu entdecken, bedient man sich der Fall-Kontroll-Studie (engl.: case- control- study), einem Studientyp, bei dem erkrankte Personen (Fälle) mit nicht erkrankten Personen (Kontrollen) bezüglich verschiedener Risikofaktoren (Exposition) verglichen werden. Im Studiendesign können die Fälle und die Kontrollen für bestimmte Parameter, wie Alter und Geschlecht, aneinander angepasst werden (matching). Die Datenerhebung erfolgt retrospektiv. Mit Hilfe von Vierfeldertafeln können die Daten ausgewertet werden. Dabei handelt es sich um eine Anordnung absoluter Häufigkeiten zweier binärer Merkmale. Ein binäres Merkmal ist eine Variable mit nur einer Ausprägung (z.B. Krankheit ja/nein, Exposition ja/nein).

Abbildung 4: Vierfeldertafel

	Krankheit liegt vor	Krankheit liegt nicht vor	
Exposition vorhanden	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>a+b</b> ( alle Exponierten)
keine Exposition	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>c+d</b> (alle nicht Exponierten)
	<b>a+c</b> (alle Kranken)	<b>b+d</b> (alle Gesunden)	<b>n</b> = Anzahl aller Fälle

Um einen Vergleich zwischen zwei Gruppen bezüglich der Erkrankung herzustellen, lassen sich aus den Zahlen die Effektmaße Odds und Odds Ratio berechnen.

#### 1.4.3.1 Odds (Chance)

$$\text{Odds (P)} = P / (1-P)$$

Odds ist das Verhältnis von der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis (z.B. eine Erkrankung) eintritt, zur Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis nicht eintritt. Bei einer Wahrscheinlichkeit von  $P=0,5$  ergibt sich eine Odds  $(P) = 0,5/0,5 = 1$  oder eine Chance von 1:1.

Für exponierte Personen ergibt sich eine Chance zu erkranken von  $A/B$ . Die Chance der nicht exponierten Personen berechnet sich aus  $C/D$ .

#### 1.4.3.2 Odds Ratio (Chancenverhältnis)

Odds Ratio (OR) ist das Verhältnis zweier Chancen. Die Berechnung erfolgt durch  $(A/B) / (C/D)$  oder  $A \cdot D / B \cdot C$

Eine OR von 1 bedeutet, dass kein Unterschied zwischen den Odds vorhanden ist; d.h., dass die Chance zu erkranken sowohl für exponierte als auch für nicht exponierte Personen gleich hoch ist, und somit keine Beziehung zwischen den Variablen besteht. Errechnet sich eine OR von  $>1$  steigt die Chance zu erkranken für die Gruppe der exponierten Personen um den Faktor  $>1$  an. Bei einer OR  $<1$  ist die Chance zu erkranken für exponierte Personen geringer als für nicht exponierte Personen (Bender und Lange 2001).

#### **1.4.3.3 $\chi^2$ - Test**

Die Aussage, dass eine Exposition eine Erkrankung beeinflusst, lässt sich durch statistische Tests untermauern. Anwendbar für die beschriebene Vierfeldertafel ist der  $\chi^2$ - Test (Chiquadrat- Test). Dieser testet die Unabhängigkeit zweier Merkmale, d.h., er stellt die Nullhypothese ( $H_0$ ) auf, dass die Variablen unabhängig voneinander in der Grundgesamtheit auftreten, bzw. dass kein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen besteht. Bei Unabhängigkeit der Krankheit von der Exposition wäre zu erwarten, dass die Verteilung der Exponierten und nicht Exponierten sowohl bei den Fällen als auch bei den Kontrollen gleich sind. Nun wird getestet, ob statistisch signifikante Abweichungen ( $p < 0,05$ ) von der unabhängigen Verteilung vorhanden sind und somit die Erkrankung bei Exposition signifikant häufiger auftritt.

#### **1.4.4 Positionsklonierung und Kandidatengene**

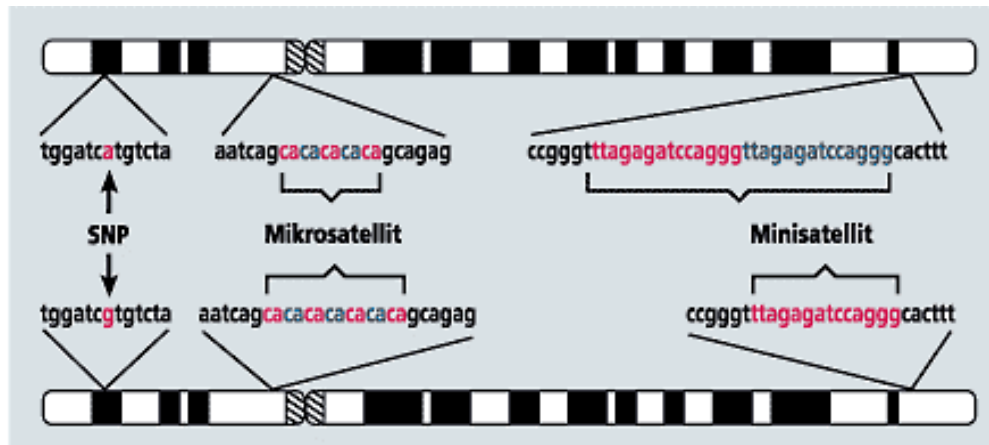
Um die verursachenden Gene klassischer Erbkrankheiten tatsächlich zu identifizieren, ist in der genetischen Forschung das Prinzip der Positionsklonierung entwickelt worden. Das erste Mal wurde diese Methode erfolgreich 1986 bei Identifizierung der Gene, die die chronische Granulomatose verursachen, angewendet (Royer-Pokora et al. 1986). Durch experimentelle und theoretische Fortschritte ist die Positionsklonierung nun auch bei polygenen Erkrankungen anwendbar. Alternativ kann ein Gen über eine Kandidatengenanalyse identifiziert werden. Kandidatengene sind Gene, bei denen aufgrund von bestimmten Eigenschaften (wie Lokalisation, Expression, Funktion oder Homologie zu anderen Systemen) ein Zusammenhang mit der Ätiopathogenese einer Krankheit vermutet wird (Ziegler 2002).

#### **1.4.5 Genetische Marker**

Wie bereits erwähnt, werden in der genetischen Diagnostik verschiedene genetische Marker verwendet. Seit den 80er Jahren nutzt man Mikro- und Minisatelliten. Dabei handelt es sich um repetitive Sequenzen in nicht kodierenden Bereichen der DNA. Seit Ende der 90er Jahre gewinnen zunehmend SNPs (single nucleotide polymorphisms) an Bedeutung. Sie liegen sowohl auf kodierenden als auch auf nicht kodierenden Sequenzen und stellen Einzelbasenaustausche dar, die mit einer Frequenz von mindestens 1% in der Population vertreten sind (Cichon et al. 2002).

SNPs machen mit etwa 90% die häufigste genetische Variabilität aus (Collins et al. 1998). In der Datenbank für SNPs (dbSNP) waren Ende des Jahres 2005 etwa 10 Millionen SNPs enthalten (Wheeler et al. 2008). Ihre Gesamtmenge wird auf ca. 11 Millionen geschätzt (Propping 2004).

Abbildung 5: Genetische Marker: Zur Vereinfachung sind die jeweiligen Marker hier eingefärbt (Cichon et al. 2002)



Diese Einzel-Nukleotid-Polymorphismen stellen also kleinste Unterschiede in der DNA Sequenz der Menschen dar, die zu einer beträchtlichen genetischen Variabilität innerhalb des humanen Genoms führt (Cichon et al. 2002; Freudenberg et al. 2002). So besitzt eine Gruppe einer Population an einer bestimmten Region eines Chromosoms z.B. die Base A (Adenosin), während eine andere Gruppe an dieser Position die Base G (Guanin) aufweist. Da alle Chromosomen (außer den Geschlechtschromosomen) in jeder Zelle zweimal vorkommen (homologe Chromosomen), können die jeweiligen Personen für das genannte Allel (A oder G) entweder homozygot oder heterozygot sein.

Abbildung 6: Homozygotie und Heterozygotie

	Person 1: Heterozygot	Person 2: Homozygot	Person 3: Homozygot
Väterliches Chromosom	A	A	G
Mütterliches Chromosom	G	A	G



### **1.4.6 Haplotyp- Blockstruktur und das HapMap- Projekt**

Im menschlichen Genom ist eine große Anzahl Einzelbasenpolymorphismen (SNPs) vorhanden. Damit man nicht jeden einzelnen auf seinen Krankheitswert überprüfen muss, macht man sich das Prinzip der Haplotyp-Blockstruktur zu nutzen. Dabei kommen im humanen Genom Regionen mit einem ausgedehnten Kopplungsungleichgewicht vor. Dies bedeutet, dass die einzelnen Allele von SNPs nicht unabhängig voneinander vorkommen, wenn diese SNPs in räumlicher Nähe auf einem Chromosom liegen. Zwei Sequenzvarianten treten also überzufällig häufig zusammen auf. Durch diese Abhängigkeit der Allele verschiedener Polymorphismen innerhalb dieser Bereiche (oder auch Blöcke) ist die Zahl der unterschiedlichen Allelkombinationen eingeschränkt. Die vorhandenen Kombinationen werden als Haplotypen bezeichnet. In der genetischen Forschung kann man also aus dem Vorliegen weniger Varianten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen der weiteren Varianten schließen und muss diese nicht separat bestimmen. Die Zahl der Polymorphismen, die einen Haplotyp sicher charakterisieren, ist also dementsprechend klein (Freudenberg et al. 2002).

Zur Aufklärung der Haplotyp-Blockstruktur haben sich mehrere Forschungszentren aus Japan, Großbritannien, Kanada, China und den USA zum internationalen HapMap Projekt ([www.Hapmap.org](http://www.Hapmap.org)) zusammengeschlossen. Dieses verfolgt das Ziel eine Haplotyp-Karte zu erstellen, die die Struktur der genetischen Variationen des menschlichen Genoms beschreibt. Diese Karte beinhaltet neben den Haplotypen verschiedener chromosomaler Regionen auch die SNPs dieser Regionen die benötigt werden, um die vorhandenen Haplotypen zu identifizieren und zu unterscheiden („tag“-SNPs). Die Reduktion der zu bestimmenden SNPs auf eine vergleichsweise geringe Anzahl führt zu einer erheblichen Kostenreduktion und macht Studien zur Entdeckung von krankheitsrelevanten Genen somit durchführbar. Die im HapMap Projekt analysierten DNA Proben stammen von insgesamt 270 Menschen mit afrikanischen, asiatischen und europäischen Wurzeln. Diese teilte man je nach Herkunft in verschiedene Populationsgruppen ein. Für die vorliegende Studie wurden Proben verwendet, die 1980 das Centre d'Etude du Polymorphisme

Humain (CEPH oder CEU) sammelte. Sie stammen von US-Amerikanern aus Utah mit nord- und westeuropäischen Vorfahren.

### **1.5 Zielsetzung**

In dieser Studie soll eine Assoziation zwischen dem funktionellen Kandidatengen *CARD8* und dem humanen kolorektalen Karzinom geprüft werden.

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Patientenkollektiv***

Im Rahmen der Studie wurden Patienten rekrutiert, die aufgrund der Diagnose kolorektales Karzinom (ICD 10 Code C18, 19 und 20) behandelt wurden. Das Gebiet beinhaltet die Bundesländer Schleswig-Holstein, den nördlichen Teil Niedersachsens, Bremen und Hamburg. Im benannten Rekrutierungsgebiet lagen 26 Krankenhäuser.

Eingebunden wurden Patienten aus den chirurgischen Abteilungen des Universitätsklinikums, des Städtischen Krankenhaus in Kiel und aus dem Krebsregister Schleswig-Holstein. Weiterhin haben das Städtische Klinikum Lüneburg, das Klinikum Rotenburg/Wümme, das Elbe Klinikum Stade, das Allgemeine Krankenhaus Hamburg Altona, das Klinikum Hamburg Eilbek, das Klinikum Lippe Detmold, das Allgemeine Krankenhaus Bergedorf, das Klinikum Reinbek, das Klinikum Nordfriesland mit den Kliniken in Niebüll und Husum, das Malteser Krankenhaus Flensburg, das Klinikum Rendsburg-Eckernförde, das Diakonissen Krankenhaus Flensburg, das Klinikum Hamburg Harburg, das Klinikum Neumünster, das Klinikum Neustadt, das Klinikum Itzehoe, das Klinikum Heide, das Klinikum Bad Oldesloe, das Allgemeine Krankenhaus Hamburg Barmbek und das Klinikum Bremen-Nord teilgenommen.

Abbildung 7: Rekrutierungsgebiet: jeder Stern stellt eine teilnehmende Klinik dar



### 2.1.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen kolorektalen Karzinom. Zusätzlich mussten die Patienten volljährig sein. Das Rekrutierungsgebiet des Popgenprojektes (Populationsgenetikprojekt siehe 2.1.2) umfasst das Gebiet nördlich des Nordostseekanals, begrenzt durch die beiden Meere und die Grenze zu Dänemark. Hier gab es bezüglich aufsteigenden Alters keine Altersbegrenzung, um in diesem Gebiet populationsbasiert zu rekrutieren. Südlich des Nordostseekanals wurde bei den rekrutierten Patienten das 65. Lebensjahr nicht überschritten, um eine Hochrisikokohorte aufzustellen.

### 2.1.2 Rekrutierungsplattform (PopGen)

Bei der Forschungsstudie PopGen handelt es sich um ein populationsgenetisches Forschungsprojekt des Universitätsklinikums Kiel, finanziert durch das Nationale Genomforschungsnetz (NGFN).

Popgen befasst sich mit der Aufgabe, die Bedeutung genetischer Prädispositionen verschiedener Erkrankungen auf Bevölkerungsebene zu prüfen. Untersucht werden

neben dem sporadischen kolorektalen Karzinom Krankheiten aus verschiedenen medizinischen Bereichen, wie die koronare Herzerkrankung, der dilatativen Kardiomyopathie, dem Gallensteinleiden, den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der chronischen und der aggressiven Parodontitis, dem Krampfaderleiden, der Epilepsie, dem Parkinson, dem essentiellen Tremor und der Bipolaren Störung. Dieses Projekt wird direkt gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und umfasst medizinische, bioinformatische, statistische sowie epidemiologische Bereiche, die sich mit dem Vorgang der Patientenidentifikation, über die Rekrutierung bis hin zur Genotypisierung befassen. Mit der PopGen Rekrutierungsstruktur ist man in der Lage ein Patientenkollektiv zu erstellen, das sowohl durch seine Größe als auch durch seine Zusammensetzung in der Lage ist, die Bevölkerung zu repräsentieren. Aus diesem Grund wurde die Art der Rekrutierung über die Forschungsstudie Popgen gewählt. Da aber im oben beschriebenen Popgen-Gebiet nicht genügend Einrichtungen zur Rekrutierung vorhanden waren, nahmen noch Kliniken außerhalb dieses Gebietes an der Studie teil.

Alle Chefsärzte der teilnehmenden Kliniken wurden von der Studienleitung persönlich besucht und über den Ablauf der Studie unterrichtet. Anschließend wurden von den Controlling- oder den EDV-Abteilungen der jeweiligen Kliniken den Einschlusskriterien entsprechende Patienten herausgesucht. Diese Patienten wurden von den behandelnden Kliniken angeschrieben und konnten sich dann mit einer Antwortkarte zur Teilnahme an der Studie bereit erklären. Im benannten Rekrutierungsgebiet lagen 17 Krankenhäuser. Zusätzlich nahmen noch 10 weitere Krankenhäuser an der Studie teil, die nicht im Rekrutierungsgebiet lagen.

### **2.2 Datenschutz und Ethik**

Die Ethik- Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel überprüfte die eingereichten Unterlagen vom 29.09.2003 des Studienplanes - Popgen- populationsrepräsentative Stichprobe für die populationsgenetische Exploration im NGFN- Phase 1 (AZ: A 156/03) - auf berufsethische und berufsrechtliche Bedenken. Die Kommission stimmte darin überein, dass für die Durchführung der Studie keine Bedenken bestehen. Auch gegen den Antrag auf Ausweitung der Studie, auf genetische Ursachen des

sporadischen Kolonkarzinoms vom 11.05.2004, bestand kein Einwand. Für den Datenschutz wurde das Prinzip der Pseudonymisierung verwendet. Für das unabhängige Landeszentrum für Datenschutz in Schleswig- Holstein bestanden im Hinblick auf das Verfahren und die zu Grunde liegende Einwilligungserklärung keine datenschutzrechtlichen Bedenken.

### **2.3 Rekrutierung**

Die infrage kommenden Patienten wurden von dem jeweiligen Klinikum auf schriftlichem Wege kontaktiert und zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Blieb eine Antwort von Seiten der Patienten aus, wurde ein Erinnerungsschreiben gesendet. Die Personen, die der Teilnahme an der Studie zugestimmt hatten, wurden dann durch Mitarbeiter des PopGen Projektes kontaktiert und dazu aufgefordert, einen zugesandten Fragebogen auszufüllen (siehe Anhang). In diesem Fragebogen wurde der Patient darum gebeten, Fragen über seine Herkunft, seine familiären Verhältnisse, seinen Gesundheitszustand und den seiner Verwandtschaft und seiner Erkrankung zu beantworten. Außerdem wurde 30ml peripher venöses Blut in ebenfalls zugesandten EDTA-Blutröhrchen abgenommen. Dieses geschah größtenteils im Rahmen einer Routineuntersuchung beim Hausarzt. Für Patienten, die in Kiel lebten oder sich dort aufhielten, bestand zusätzlich das Angebot, sich das Blut von Studienmitarbeitern abnehmen zu lassen. Weiterhin waren alle Studienteilnehmer dazu verpflichtet ihre schriftliche Einwilligung zu geben, mit der sie sich auch bereit erklärten, Gewebeproben zur Verfügung zu stellen (siehe Anhang).

### **2.4 Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe wurde in der 1. Medizinischen Klinik des UKSH Kiel gebildet. Sie rekrutierte sich aus mindestens 18 jährigen Patienten, bei denen endoskopisch nachgewiesen wurde, dass sie kein Kolonkarzinom und keine Kolonpolypen aufwiesen. Der Nachweis von Kolonpolypen, Kolonkarzinom oder einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa, führte zum Ausschluss aus der Kontrollgruppe.

Nach Zusage der Teilnahme an der Studie und nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung füllten auch die Kontrollpersonen einen Fragebogen aus (siehe Anhang) und sendeten 30 ml venöses Blut.

## **2.5 Genotypisierung**

### **2.5.1 DNA-Extraktion**

Die Extraktion der DNA aus 10ml Vollblut wurde mit Hilfe des FlexiGene DNA Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) vorgenommen.

Dazu wurden 25ml eines Lyse- Puffers (FG1) und das Blut in ein 50ml umfassendes Röhrchen gefüllt und einige Male bis zur vollständigen Lyse der Blutzellen umgeschwenkt. Durch die anschließende Zentrifugierung des Röhrchens für fünf Minuten bei 2000 g, setzten sich die Zellkerne und die Mitochondrien am Röhrchenboden ab. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes, wurden 50 µl Protease und 5 ml des denaturierenden Puffers (FG2) hinzugefügt. Dieser Puffer enthielt ein chaotropes Salz, welches in der Lage war Makromoleküle wie Proteine und DNA-spaltende Enzyme (Dnase), nicht jedoch DNA, zu denaturieren. Direkt nach Zugabe dieser zwei Substanzen musste die Probe sorgfältig gemischt werden, bis sich in dem Röhrchen eine homogene Flüssigkeit befand. Nun wurde die Probe in einem 65°C warmen Wasserbad für 15 Minuten inkubiert. Die Protease sorgte für die enzymatische Aufspaltung der enthaltenen zellulären Proteine und der DNA-gebundenen Histonproteine. Als Nächstes wurden 5ml Isopropanol hinzugefügt und durch Umschwenken des Röhrchens mit der Probe vermischt. Nach einigen Sekunden fiel die DNA in Form einer weißlichen, fädigen Substanz aus. Mit Hilfe der Zentrifugierung (drei Minuten bei 2000 g) konzentrierte sich nun die DNA am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde im nächsten Schritt sorgfältig abgegossen. Um zelluläre Verunreinigungen und verbliebenes Salz zu entfernen, wurde das DNA-Pellet im Anschluss mit Hilfe von 5ml 70%igen Ethanol gewaschen. Nun erfolgte eine weitere Zentrifugierung für drei Minuten bei 2000 g und das Verwerfen des Überstandes. Um Ethanolreste zu entfernen, wurde die DNA anschließend an der Luft getrocknet. Im letzten Schritt wurde das Erbmateriale durch die Zugabe des Hydratationspuffers (FG3) und durch Inkubation in einem 65°C warmen Wasserbads (für eine Stunde), gelöst.

Die DNA-Qualität der Proben wurde dann mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte dann quantitativ mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Picogreen (Molecular Probes- Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA). Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration der Proben auf 20-30ng/µl eingestellt.

### **2.5.2 Whole Genom Amplification (WGA)**

Bei der WGA handelt es sich um eine Amplifikationsmethode, bei der identische Kopien des gesamten vorhandenen Genoms hergestellt werden. Diese Methode ermöglicht den ressourcenschonenden Umgang mit wertvoller Probanden-DNA und stellt zugleich sicher, dass auch bei einer geringen Menge von Ausgangsmaterial (wenige Nanogramm) ausreichend DNA für die folgenden Analysen vorhanden ist. Hierzu wurde das WGA-Kit von GenomiPhi (Amersham, Uppsala, Schweden) verwendet. Der Amplifikationsprozess basierte auf nachfolgenden Schritten:

- 1.) Genomweite Bindung von Zufalls-Hexamer-Primern an denaturierter Probanden-DNA
- 2.) Paralleler Replikationsbeginn und DNA-Polymerisation an multiplen Loci mittels der DNA- Polymerase Phi29
- 3.) Generierung neuer Einzelstrang-Matrizen-DNA durch Strangersetzungsreaktionen
- 4.) Erneute Anlagerung von Zufalls-Hexamer-Primern und DNA-Polymerisation

Dazu fügte man 1 µl der isolierten DNA und 9 µl des Sample- Puffers (dieser enthielt die Hexamer-Primer) zusammen. Im nächsten Schritt wurde die DNA durch eine 3-minütige Erhitzung bei 95°C denaturiert. Dann wurde die Probe sofort auf Eis gestellt und dadurch bis auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend fügte man 9µl des Reaktionspuffers und 1µl der Enzymmischung hinzu. Im Reaktionspuffer sind die zur Amplifikation benötigten Desoxyribonukleotide enthalten. Dieser besteht zudem aus verschiedenen Salzen, die einen optimalen pH- Wert für die bevorstehende enzymatische Reaktion sicherstellen. Die Amplifikation erfolgte isothermal bei 30°C für 16- 18 Stunden (übernacht). Als nächstes wurde das Enzym durch 10- minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Daraufhin wurde die Probe nochmals auf 4°C abgekühlt. Im Röhrchen war nun amplifizierte DNA vorhanden. Durch Erhitzen auf 99°C für 3 Minuten wurde die DNA fragmentiert und schließlich bei Raumtemperatur getrocknet.



### 2.5.3 Genotypisierung mit dem SNPlex System

Die Genotypisierung erfolgte unter der Verwendung der SNPlex Reagenzien (Applied Biosystems, Foster City, USA) auf einer robotergesteuerten Plattform. Eingesetzt wurde dazu der TECAN Freedom EVO- und der 384well TEMO liquid handling-Roboter (TECAN, Männedorf, Schweiz).

Diese Art der Genotypisierung nutzt die Ligation von Oligonukleotiden, um allelische Unterschiede sichtbar zu machen. Außerdem wird sie mit der PCR- Technologie kombiniert, um bestimmte Nukleotidsequenzen gezielt zu vermehren. Mit dieser Technologie ist es möglich, bis zu 48 SNPs in einer Reaktion zu genotypisieren. Von vorrangiger Bedeutung bei dieser Methode sind SNP- spezifische Oligonukleotide. Bei den SNP- spezifischen Oligonukleotiden wird für jeden SNP zwischen zwei Allel-spezifischen Oligonukleotiden (ASOs) und einem Locus- spezifischen Oligonukleotid (LSO) unterschieden.

Weitere Bestandteile der SNPlex-Reagenzien sind die ASO- und LSO- Linker. Die ASO- Linker besitzen neben den Bindungsstellen für die Oligonukleotide eine universelle PCR-Primer Region und eine charakteristische ZipCode Sequenz. An diese Sequenz hybridisiert im weiteren Verlauf eine komplementäre ZipChute Probe. Eine ZipChute Probe ist eine universelle fluoreszenzmarkierte Oligonucleotidsonde mit einem einmaligen strukturellen Merkmal, welches eine festgelegte Mobilitätsrate während der Elektrophorese gewährleistet. Beide Allele eines SNP-Locus werden durch ein ZipChute Probenpaar repräsentiert, die sich nur in diesem strukturellen Merkmal unterscheiden. Beide ZipChute Proben sind mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff versehen. SNPlex arbeitet mit insgesamt zwei verschiedenen Fluorophoren.

Somit wird die genetische Information eines SNP-Locus bei SNPlex zuerst in der ZipCode Sequenz gespeichert und im späteren Verlauf mittels ZipChute Proben in elektrophoretische Mobilitätsunterschiede umkodiert, die dann mittels Kapillarsequenziergeräten detektiert werden.

Im ersten Schritt der Genotypisierung erfolgte die Aktivierung sowohl der SNP-spezifischen Proben, als auch der Linker durch Phosphorylierung des 5'-Endes. Dabei wurde der Phosphatrest durch eine Kinase von dATP auf das jeweilige Substrat übertragen. Als nächstes wurden die fragmentierte gDNA, Ligase und ein Ligationspuffer hinzugefügt. Die Ligase katalysierte nun Reaktionen, durch die sowohl die DNA mit den SNP-spezifischen Oligonukleotiden, als auch die Linker mit

den Oligonukleotiden eine Verbindung eingingen. Bei der Purifikation wurden nun ungebundene, sowie nicht vollständig gebundene Bestandteile der DNA und der Oligonukleotide, entfernt. Dazu wurden Exonuklease I und Exonuklease lambda beigelegt, die in der Lage sind, diese Nukleinsäuremoleküle zu spalten. Um zu verhindern, dass auch die gebundenen Substanzen von den Enzymen abgebaut werden, sind die Linker mit einem internen Spacer synthetisiert. Dieser sorgte dafür, dass die Exonuklease dort nicht angreifen kann. Im nächsten Schritt wurden die Ligationsprodukte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurde ein Set mit universellen Primern verwendet, von denen die reverse Primer biotinyliert vorlagen. Nach Ende der Amplifikation wurde der biotinylierte DNA-Strang durch Streptavidin überzogene Platten erfasst und festgehalten. Dabei gingen Biotin und Streptavidin eine irreversible Bindung ein. Durch nachfolgende Denaturierung und Entfernen des Überstandes blieb nur der biotinylierte Strang zurück.

Zur Dekodierung der allelischen Information der Ligationsprodukte wurden nun die ZipChute Proben hinzugefügt. Es folgte eine Hybridisierung dieser mit den ZipCode Sequenzen der Einzelstränge. Im nächsten Schritt wurden die ZipChute Proben von den biotinylierten Strängen abgelöst und mit Hilfe des 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) elektrophoretisch getrennt. Die Datenanalyse erfolgt durch die Software GeneMapper 4.0. (Applied Biosystems).

#### **2.5.4 Auswahl der SNPs**

Für die Kandidatengene wurden die Singel-Nucleotide-Polymorphisms (SNP) durch die automatische Selektion von haplotype tagging SNPs für Kaukasier aus HapMap ausgewählt. Hierfür wurden die Daten der kaukasischen HapMap-Stichprobe aus dem Centre d'Étude du Polymorphisme Humain collection (CEU) unter folgenden Voraussetzungen genutzt: Mendel-Fehler sollten nicht auftreten, die geringste Allel-Frequenz sollte mindestens 0,01 betragen und der p-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sollte ebenso bei 0,01 liegen. Außerdem wurden coding SNPs eingeschlossen, deren Allel-Frequenz in der kaukasischen Bevölkerung größer als 0,005 ist. Diese SNPs stammen sowohl aus der NCBI dbSNP Datenbank, als auch aus SNPs, von denen in der Literatur bereits eine Assoziation zum sporadischen kolorektalen Karzinom beschrieben wurde.

## **2.6 Analyse**

Als Methode der Daten-Analyse wurde die Sliding-Window-Haplotypen Analyse gewählt. Das besondere an dieser Auswertungsmethode ist die Einteilung der Kandidatenregion in kleinere Analyse-Abschnitte. Jedes so geschaffene Analyse-Fenster wurde getrennt auf das Vorhandensein möglicher Assoziationen untersucht. Die Sliding-Window-Methode wurde aus folgenden Gründen durchgeführt:

Durch die Einteilung in Analyse-Abschnitte erreichte man, dass die Zahl der Haplotyp-Strukturen in jedem Fenster geringer war, als die in der gesamten Kandidatenregion. Infolgedessen müssen in die einzelne Analyse weniger Parameter einbezogen werden. Dadurch stieg die Power, eine mögliche Assoziation zwischen dem Haplotyp und der Erkrankung zu erkennen. Man ging davon aus, dass eine Genstruktur, die nahe an der wahren krankheitsauslösenden Variante liegt, eine stärkere Assoziation aufweist, als andere Regionen. Daher wurde angenommen, dass eine Assoziation in einem kleinen Fenster besser zu erkennen sei, als wenn der Haplotyp direkt untersucht würde (Zhao et al. 2003).

Für die in dieser Studie durchgeführte Sliding-Window-Haplotypen-Analyse wurde das UNPHASED-System benutzt. UNPHASED ist ein Programm für die Assoziations-Analyse von multilokulären Haplotypen. Ein Teilprogramm für die Analyse von Fall-Kontroll-Daten ist COCAPHASE, das in dieser Studie angewandt wurde (Dudbridge 2003). Für die Auswertung wurden der  $X^2$ -Test und Kontingenz-Tafeln verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gesamtkollektiv

Insgesamt wurden an 26 Abteilungen in Schleswig-Holstein, Hamburg und Nordniedersachsen Patienten rekrutiert. Hier wurden insgesamt 10.913 Patienten am kolorektalen Karzinom operiert. Von diesen konnten 3.630 wegen Todes oder nicht ermittelbarem Umzug nicht kontaktiert werden. Die restlichen 7283 Patienten erhielten die Einladung an der Studie teilzunehmen. Eine direkte Absage wurde nur von 375 Patienten erteilt. Einige Patienten schickten allerdings nur unvollständige Unterlagen ein oder zogen Ihre Teilnahme später aus verschiedenen Gründen zurück, so dass mit 2879 Patienten mit vollständigen Unterlagen eine Teilnahme von 39,5% erreicht wurde. Die Tabelle 2 gibt einen detaillierten Überblick des Gesamtkollektivs.

Tabelle 2: Demographie des Gesamtkollektivs

Klinik	Angeschrieben	Verzogen, verstorben	Kontakt	Absage	Teilnahme gesamt	Teilnahme %
UKSH-Kiel	1402	567	835	95	473	56,6
Krebsregister	667	140	527	11	177	33,6
Städt. KH Kiel	822	213	609	4	169	27,8
Lüneburg	335	169	166	24	142	85,5
Rotenburg	324	67	257	11	98	38,1
Stade	118	39	79	0	41	51,9
HH-Altona	309	68	241	8	130	53,9
Eilbek	409	157	252	24	80	31,7
Detmold	215	27	188	5	95	50,5
HH-Bergedorf	19	1	18	1	7	38,9
HH-Reinbek	236	46	190	13	90	47,4
Schleswig	794	266	528	41	236	44,7
Malteser- Flensburg	399	124	275	17	103	37,5
Rendsburg	1386	629	757	41	209	27,6
Eckernförde	470	155	315	7	48	15,2
Niebüll	239	108	131	12	29	22,1
Husum	464	202	262	18	79	30,2
Itzehoe	356	97	259	10	111	42,9
Neumünster	116	22	94	1	55	58,5
HH-Harburg	188	54	134	4	59	44
Neustadt	89	15	74	1	47	63,5
Diako- Flensburg	127	58	69	5	21	30,4
Heide	585	198	387	14	165	42,6
Bad Oldesloe	27	1	26	1	5	19,2
Bremen-Nord	90	2	88	0	45	51,1
HH-Barmbek	727	205	522	7	159	30,5
<b>SUMME</b>	<b>10913</b>	<b>3630</b>	<b>7283</b>	<b>375</b>	<b>2879</b>	<b>39,5</b>

Aus diesen wurden, wie in Tabelle 3 dargestellt, 1044 Fälle und 724 Kontrollen in die untersuchte Stichprobe eingeschlossen. Die beiden Gruppen wurden hinsichtlich der Geschlechterverteilung und der Altersstruktur angepasst. Der Anteil der teilnehmenden Männer und Frauen lag in beiden Gruppen bei 50 % und war somit ausgeglichen. In der Kontrollgruppe lag das mittlere Alter bei 68 Jahren und damit etwas über dem der Patientengruppe von 63 Jahren. Dieser Umstand wurde bewusst gewählt, um sicher sein zu können, dass die Kontrollen, bei denen koloskopisch ein KRK ausgeschlossen werden konnte, mit 63 Jahren noch keine Karzinomvorstufen hatten. Diese wären dann in der 5 Jahre später durchgeführten Koloskopie aufgefallen.

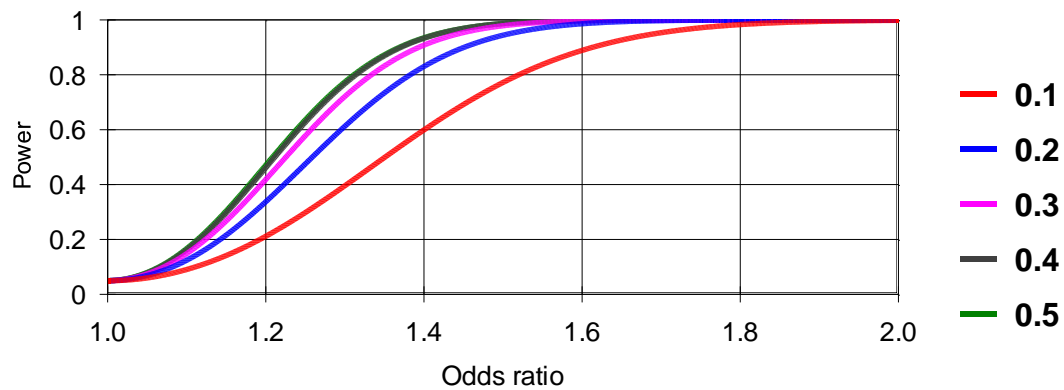
Tabelle 3: Überblick der untersuchten Stichprobe

<b>Stichprobe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>mittleres Alter</b>	<b>% männlich</b>
Fälle	1044	63	50%
Kontrollen	724	68	50%

### **3.2 Power-Schätzung**

Zur Evaluation einer möglichen Assoziation zwischen einer von uns untersuchten Genvariante und dem kolorektalen Karzinom schätzen wir die Power der Studie. Dabei berechneten wir die Power für ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  über ein Odds Ratio von 1-2 für drei verschiedene Allelhäufigkeiten (MAF: *minor allele frequencies*), welche bei 0.1, 0.2 und 0.5 lagen. Für die Erkennung von Odds Ratios von mehr als 1.54 lag die geschätzte Power bei 80 %. Für die Varianten mit einer häufigeren Allelfrequenz von 0.2 und 0.5 wären bereits Odds Ratios von 1.3 mit einer Power von 80 % erkennbar gewesen. Die Abbildung 8 stellt die Power anhand des Chancenverhältnisses (Odds Ratio) dar und wurde mit Hilfe des PS- Power-Programms erstellt.

Abbildung 8: Power-Schätzung

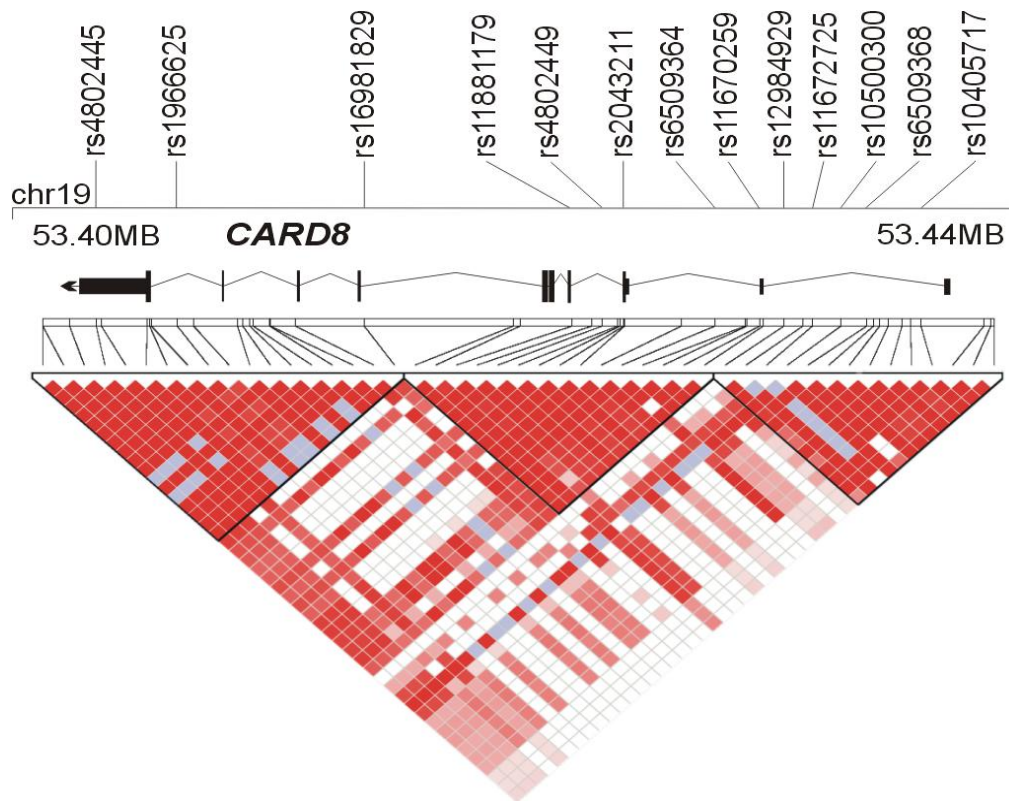


### 3.3 Ergebnisse der SNP-Analysen

#### 3.3.1 Durchführung der Assoziationstudie

Um das *CARD8*-Gen möglichst gut wiederzugeben, wurden anhand der für dieses Gen verfügbaren Daten der HapMap-Datenbank die haplotyp-spezifischen SNPs ausgewählt. Wie in Abbildung 9 wiedergegeben, decken 13 SNP-Marker das gesamte Gen ab, die in unserer Studie untersucht wurden. Sie zeigt einen Überblick über die Verteilung der SNPs auf der Kandidatengen-Region und gibt die Struktur des Abschnitts wieder.

Abbildung 9: Struktur des *CARD8*-Gens



Der obere Teil der Abbildung zeigt die physikalische Position der ausgewählten SNPs. Die Abstände zueinander sind in Megabasen angegeben. Die Zeile darunter stellt die Lage der SNPs in Bezug zur Genstruktur dar. Die senkrechten Striche stehen für die Exon-Bereiche im Gen, die dazwischen liegenden Abschnitte für die Introns. Die angegebenen Koordinaten beziehen sich auf die Version 34 des Genomaufbaus. Der untere Teil der Abbildung gibt einen Überblick über die Struktur des Kopplungsungleichgewichtes dieser Genorte. Erstellt wurde die Abbildung mittels Haploview, einem Programm zur Analyse von Kopplungsungleichgewichten und Haplotyp-Karten.

Die ausgewählten SNPs decken durch ihre Lage alle größeren Haplotyp-Blöcke des Kandidatengens ab und stellen somit eine hohe Aussagekraft dar.

### 3.3.2 Ergebnisse der Analyse

Die Tabelle 4 fasst die einzelnen Ergebnisse der Analyse zusammen: Dargestellt ist unter der Spalte „dbSNPId“ die Bezeichnung des analysierten SNPs. Die Spalte „Position“ zeigt die Lage des SNPs auf dem Gen an. Zudem sind die geringsten Allelfrequenzen (MAF: *minor allele frequencies*) sowohl für die Fälle (MAFcase) als auch die Kontrollen (MAFcont) angegeben. „ORdom“ und „ORRec“ bezeichnen die

Odds Ratios der dominanten- und rezessiven Vererbungsmodi. Die zugehörigen Konfidenzintervalle (CI 95 %) sind in den eckigen Klammern aufgeführt. Die p-Werte sind jeweils für die allelische- (P<sub>allelic</sub>) und die genotypische Assoziation (P<sub>geno</sub>) dargestellt. Ausnahme bildeten die Marker, deren Allel-Frequenz zu gering war. Hierzu wurden keine Odds Ratios oder p-Werte berechnet. Stattdessen wurde in der Tabelle die Abkürzung „n/a“ (*not available*) verwendet. Die Spalten „HAP2“ bis „HAP5“ beziehen sich auf die p-Werte für Assoziationen in der Sliding-Window-Haplotyp-Analyse, unter Verwendung des Programms COCAPHASE. Die Anzahl der Marker, die für die Haplotypenanalyse verwendet wurde, ist der Bezeichnung „HAP“ nachgeordnet. Der errechnete p-Wert wird in der Zeile dargestellt, in der der erste Marker des jeweiligen untersuchten Fensters steht. Aus diesem Grund ist in der letzten Zeile kein p-Wert, sondern nur eine Raute (#) angegeben, da der dazugehörige p-Wert bereits in der Zeile darüber dargestellt ist. Für die Spalten „HAP3“ bis „HAP5“ wurde dasselbe Verfahren angewendet.

Tabelle 4: Ergebnisse der Analyse

CARD8													
MAF MAF													
No.	dbSNP id	Position	case	cont	OR <sub>Rec</sub> [CI <sub>95%</sub> ]	OR <sub>dom</sub> [CI <sub>95%</sub> ]	P <sub>allelic</sub>	P <sub>geno</sub>	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5	
A) 1044 CRC patients vs 724 sex-matched control individuals													
1	rs4802445	3'UTR	0.44	0.45	0.90 [0.69-1.18]	0.95 [0.78-1.17]	0.454	0.726	0.549	0.540	0.615	0.305	
2	rs1966625	intron	0.09	0.10	0.37 [0.15-0.93]	0.94 [0.74-1.21]	0.321	0.090	0.552	0.463	0.368	0.726	
3	rs16981829	intron	0.33	0.33	0.99 [0.72-1.38]	1.01 [0.83-1.22]	0.967	0.987	0.998	0.419	0.712	0.697	
4	rs11881179	V68I	0.001	0.001	n/a*	1.04 [0.17-6.25]	0.965	0.965	0.975	0.999	0.971	0.518	
5	rs4802449	intron	0.34	0.34	1.07 [0.78-1.45]	0.92 [0.76-1.11]	0.829	0.339	0.966	0.828	0.406	0.488	
6	rs2043211	CI0Ter	0.32	0.32	1.05 [0.76-1.45]	1.01 [0.83-1.22]	0.827	0.950	0.907	0.474	0.477	0.549	
7	rs6509364	intron	0.34	0.34	0.93 [0.69-1.27]	1.08 [0.89-1.31]	0.861	0.356	0.593	0.642	0.661	0.602	
8	rs11670259	intron	0.35	0.34	1.13 [0.84-1.53]	1.04 [0.86-1.25]	0.497	0.709	0.483	0.592	0.675	0.517	
9	rs12984929	intron	0.41	0.39	1.27 [0.95-1.69]	1.02 [0.83-1.24]	0.222	0.099	0.545	0.760	0.343	0.417	
10	rs11672725	intron	0.20	0.19	1.21 [0.76-1.94]	0.98 [0.80-1.20]	0.859	0.608	0.819	0.865	0.350	#	
11	rs10500300	intron	0.08	0.08	2.10 [0.57-7.80]	1.05 [0.81-1.36]	0.565	0.521	0.820	0.226	#	#	
12	rs6509368	intron	0.44	0.44	1.01 [0.77-1.32]	1.03 [0.84-1.26]	0.900	0.931	0.544	#	#	#	
13	rs10405717	intron	0.15	0.17	0.73 [0.42-1.29]	0.91 [0.74-1.12]	0.284	0.497	#	#	#	#	

In Tabelle 5 wird die Analyse der Subgruppe der Patienten jünger als 50 Jahre dargestellt. Hier zeigen sich teilweise signifikante P-Werte. So in der Sliding-Window-Haplotyp-Analyse mit den 5 SNPs 3-7, den 4 SNPs 4-7 und 6-9, den 3 SNPs 5-7, 6-8 und 7-9, den 2 SNPs 6-7 und 7-8. Des Weiteren weisen die genomischen Assoziationen für die SNPs 5 und 7 P-Werte auf, die eine Signifikanz zeigen und die allelische Assoziation für den SNP 7. Der SNP 7 weist von allen die häufigsten P-Werte auf, die Signifikanz bedeuten.



Tabelle 5: Ergebnisse der Analyse der jungen Subgruppe

CARD8 MAF MAF												
No.	dbSNP id	Position	case	cont	OR <sub>Rec</sub> [CI <sub>95%</sub> ]	OR <sub>dom</sub> [CI <sub>95%</sub> ]	P <sub>allelic</sub>	P <sub>geno</sub>	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5
B) 143 CRC patients (age at diagnosis ≤50 ) vs 639 sex-matched control individuals												
1	rs1966625	intron	0.07	0.1	n/a*	0.79 [0.48-1.31]	0.200	0.252	0.322	0.373	0.388	0.692
2	rs16981829	intron	0.31	0.33	1.02 [0.56-1.84]	0.86 [0.60-1.24]	0.663	0.566	0.603	0.388	0.647	0.729
3	rs11881179	V68I	0	0.002	n/a*	n/a*	0.503	n/a*	0.166	0.280	0.372	<b>0.039</b>
4	rs4802449	intron	0.39	0.34	1.66 [0.96-2.86]	1.22 [0.84-1.77]	0.100	0.180	0.232	0.341	<b>0.028</b>	0.131
5	rs2043211	<b>CI0Ter</b>	0.29	0.32	1.06 [0.61-1.86]	0.65 [0.45-0.94]	0.225	<b>0.008</b>	0.251	<b>0.024</b>	0.144	0.067
6	rs6509364	intron	0.32	0.33	0.95 [0.53-1.69]	0.90 [0.62-1.29]	0.668	0.817	<b>0.004</b>	<b>0.031</b>	<b>0.020</b>	0.092
7	rs11670259	intron	0.43	0.34	2.23 [1.34-3.72]	1.40 [0.96-2.04]	<b>0.004</b>	<b>0.007</b>	<b>0.023</b>	<b>0.018</b>	0.118	0.159
8	rs12984929	intron	0.37	0.39	0.99 [0.57-1.69]	0.80 [0.55-1.16]	0.595	0.314	0.865	0.441	0.332	0.407
9	rs11672725	intron	0.2	0.2	1.09 [0.43-2.73]	1.04 [0.71-1.51]	0.830	0.976	0.755	0.575	0.615	-#
10	rs10500300	intron	0.09	0.08	4.58 [0.28-	1.11 [0.68-1.81]	0.583	0.486	0.590	0.750	-#	-#
11	rs6509368	intron	0.47	0.44	1.19 [0.71-1.99]	1.16 [0.78-1.73]	0.479	0.756	0.585	-#	-#	-#
12	rs10405717	intron	0.17	0.16	0.78 [0.23-2.71]	1.15 [0.78-1.69]	0.648	0.631	-#	-#	-#	-#

Das Entscheidende ist allerdings, dass bei der allgemeinen Analyse der ausgewählten SNPs für das *CARD8*-Gen keine Assoziation mit dem kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden konnte. Auch bei den Sliding-Window-Haplotyp-Analysen konnte kein anderes Ergebnis gezeigt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 *Familiäre Häufung des kolorektalen Karzinoms*

Bei vielen Krankheiten konnten genetische Einflüsse, die zur Entstehung beitragen, bereits bewiesen werden (Erdmann et al. 2009; Kathiresan et al. 2009; Tregouet et al. 2009). Allerdings ist es häufig nicht bekannt, wie groß die Rolle der genetischen Komponente dabei ist. Nun sind mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahre 2000 die Möglichkeiten der genetischen Forschung vielfältig gewachsen.

In der klinischen Praxis des KRK fallen vor allem junge Patienten auf, bei denen eine familiäre Disposition wahrscheinlich zu sein scheint. Immerhin bei einem Drittel der Patienten mit einem kolorektalem Karzinom liegt eine positive Familienanamnese vor (Davidson 2007). Von diesen hat allerdings der Großteil, ca. 95%, die sporadische Variante des KRK. Hierbei wird ein komplexes Wechselspiel zwischen exogenen Faktoren, wie zum Beispiel der Ernährung, und endogenen Faktoren, hier die genetische Grundausstattung des Patienten (Kemp et al. 2004) vermutet. Dies zeigen mindesten 11 Studien, die ein bis zu 7,5fach erhöhtes Risiko, an KRK zu erkranken, für Angehörige von Patienten aufweisen (Woolf 1958; Lovett 1976; Duncan und Kyle 1982; Maire et al. 1984; Ponz de Leon et al. 1987; Bonelli et al. 1988; Fisher und Armstrong 1989; Kune et al. 1989; Sondergaard et al. 1991; Stephenson et al. 1991; St John et al. 1993; Fuchs et al. 1994; Goldgar et al. 1994). Dieses Risiko wird noch höher, wenn es sich um Verwandte ersten Grades junger Patienten oder Verwandte von mit mehreren Patienten handelt (Johns et al. 2002; Andrieu et al. 2003; Butterworth et al. 2006). Bei Studien zu den relativen Geschwisterrisiken konnte gezeigt werden, dass das Risiko am KRK zu erkranken bei Geschwistern von Patienten höher ist als bei anderen Verwandten. Hierbei kommt die Frage auf, ob die Ursache dafür in der Genetik oder in den vergleichbaren Lebensgewohnheiten zu suchen ist. Hemminki und Chen untersuchten ihre Population auf diese Fragestellung hingehend, indem sie Geschwister mit großem Altersunterschied, bei denen auch ein Unterschied in den Lebensgewohnheiten zu erwarten ist, verglichen. Dabei konnten sie keine Unterschiede beim relativen Risiko feststellen. Des Weiteren konnten sie keine Unterschiede bei langjährigen Eheleuten aufzeigen, die sich in ihren Lebensgewohnheiten angepasst haben (Hemminki und

Chen 2004). Somit kann man also eine entscheidende Rolle der Gene eines Patienten bei der Krankheitsentstehung vermuten.

Lichtenstein et al. konnten 2000 im Rahmen einer Zwillingsstudie den Anteil der vererbten Faktoren auf 35 Prozent konkretisieren. Den genauen Mechanismus oder eine oder mehrere Mutationen konnten sie allerdings nicht zeigen (Lichtenstein et al. 2000).

Anhand der vorgestellten Studie kann man feststellen, dass die Genetik eine wichtige Rolle bei der Entstehung des KRK zu spielen scheint. Leider decken die vorliegenden Studien die weiterhin vorhandenen Lücken nur unzureichend, so dass es sinnvoll erscheint, weitere Studien zur Klärung der gebliebenen Fragen durchzuführen.

## **4.2 Molekulargenetische Assoziationsstudie**

Die vorliegende Studie wurde als Fall-Kontroll-Studie geplant. Dafür ist eine Studienpopulation vonnöten, die bestimmte Bedingungen erfüllt. Im Vordergrund steht hier die Vergleichbarkeit von Fällen und Kontrollen, das kann erreicht werden, wenn sich beide Gruppen, wenn möglich, nur in dem zu untersuchenden Merkmal unterscheiden. Dieses soll mittels Matching erfolgen. Unsere Probanden wurden bezüglich des Alters und der Geschlechterverteilung gematcht. Dadurch wurde ein annähernd gleiches mittleres Alter von 63 Jahren in der Patienten- und 67 Jahren in der Kontrollgruppe erreicht. Eine große Gefahr bei Fall-Kontroll-Studien sind die so genannten Confounder und dem darin begründeten systematischen Fehler (Bias). Damit dieser nicht durch ethnische Unterschiede entstehen kann, wurden nur Patienten mit in Deutschland geborenen Eltern in die Studie einbezogen. Zusätzlich muss eine Kohorte für Deutschland repräsentativ sein, also einer geringen Zu- und Abwanderung unterliegen. Die PopGen-Rekrutierungsplattform kann eine solche Kohorte in Norddeutschland zur Verfügung stellen, die weiterhin auch im Hinblick auf die Umstände, die zum Auftreten komplexer Erkrankungen beitragen, nicht von anderen Regionen abweicht, wie Krawczak et al. 2006 zeigen konnten (Krawczak et al. 2006). Dass das Regierungsgebiet für die Erstellung einer Kohorte für Fall-Kontroll-Studien geeignet ist, zeigt auch die Tatsache, dass keiner der untersuchten SNP-Marker in der Kontroll-Gruppe signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweicht.

Um eine möglichst hohe Power zu erreichen, konnte überregional in den beteiligten Kliniken mit 2984 Patienten die größte Kohorte national und die viertgrößte Kohorte international erschaffen werden. Somit waren für eine solche Studie bestmögliche Voraussetzungen geschaffen.

#### **4.3 Assoziation der Kandidatengene zum sporadischen KRK**

Mit der vorliegenden Studie sollte eine mögliche Assoziation von Mutationsvarianten des *CARD8*-Gens, das unter anderem an der Entstehung von Entzündungen beteiligt ist, und dem kolorektalen Karzinom untersucht werden.

Die Wahl fiel auf dieses Kandidatengen, weil viele Krebserkrankungen auf dem Boden einer chronischen Entzündung entstehen, wie an der Tatsache ersichtlich ist, dass Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, wie Morbus Crohn, ein erhöhtes Risiko haben, an KRK zu erkranken (Balkwill und Mantovani 2001). Studien zur Ätiologie des Morbus Crohn konnten eine Assoziation mit Mutationsvarianten des *CARD15*-Gens darlegen, einem Verwandten, des von uns untersuchtem *CARD8*, der am angeborenen Immunsystem teilnimmt (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001). Auf diese Beobachtung gestützt wurde vermutet, dass Genvarianten, von Genen des angeborenen Immunsystems, wie *CARD8*, als Suszeptibilitätsfaktoren für das KRK gelten könnten.

In der durchgeführten Studie konnte allerdings keine eindeutige Assoziation zwischen dem KRK und von Mutationen des *CARD8*-Gens gezeigt werden. Da die Ursache dafür wahrscheinlich nicht im Studiendesign zu suchen ist, sollten nun weitere Studien zur Erklärung von Diskrepanz zwischen Erwartungen und Ergebnis zu Rate gezogen werden.

Schon bei der zur Grunde liegenden Annahme, ein Verwandter des *CARD15*-Gens, könnte ebenfalls eine Assoziation mit dem KRK haben, wurde übersehen, dass dieses nicht in allen Studien bestätigt werden konnte. So konnten zwar in Polen, Griechenland und Neuseeland eine Assoziation gezeigt werden (Kurzawski et al. 2004; Papaconstantinou et al. 2005; Roberts et al. 2006). Allerdings konnten andere Studien nur eine signifikante Erhöhung dreier Mutationsvarianten des Gens, aber keine Assoziation, feststellen (Alhopuro et al. 2004; Lakatos et al. 2007; Tuupanen et al. 2007). Es ist also noch nicht gesichert, dass der Verwandte von *CARD8*, eine Assoziation mit dem KRK aufweisen kann. Vielleicht könnte dies erklären, warum die

vorliegende Studie ebenfalls keinen eindeutigen Risikofaktor in Mutationen des *CARD8*-Gens selbst finden konnte.

Des Weiteren ist die Funktion von *CARD8* in der komplexen Entzündungspathologie noch nicht geklärt. Besonders sind die Wirkungen von NFκB, ein von *CARD8* reguliertes Protein, auf die Entzündung noch nicht abschließend geklärt. Auch ob die daraus resultierende Entzündung durch ein wachstumsförderndes Milieu die Krebsentstehung fördert oder durch das Anschwemmen von Immunzellen eher krebslimitierend wirkt, ist derzeit noch Stand der Forschung.

Ebenso ist die Funktion von *CARD8* auf die Apoptose noch unklar. Während Pathan et al. beschrieben, dass *CARD8* die Apoptose hemmt, indem es die Aktivierung der Caspasen durch Apaf1 kompetitiv hemmt (Pathan et al. 2001), konnte dies in Studien von Bouchier-Hayes et al und Razmara et al. nicht bestätigt werden. Razmara et al. konnten sogar zeigen, dass *CARD8* die Zellen sogar für apoptotische Reize sensibler macht (Razmara et al. 2002; Bouchier-Hayes und Martin 2004). Auch diese Unklarheiten in den genauen Pathomechanismen könnten nun eine Erklärung für das negative Ergebnis unserer Studie sein.

Dennoch konnten wir in der Subgruppe der besonders jungen Patienten durchaus Assoziationen mit SNPs auf *CARD8* feststellen. Leider können diese bei der geringen Fallzahl nicht als signifikant gewertet werden. Es bleiben also weitere Untersuchungen mit größerer Fallzahl notwendig, um auch hierzu eine endgültige Aussage treffen zu können.

#### **4.4     *Klinische Bedeutung/ Ausblick***

Aus zwei entscheidenden Gründen ist eine weitere Erforschung der prädisponierenden Gene sehr wichtig. Zum einen verringert das Entfernen der Vorstufen des kolorektalen Karzinoms das Auftreten vom KRK selbst. Dies impliziert gleichzeitig ähnliche klinische Vorteile, wenn ein KRK vor seinem Auftreten identifiziert würde. Zum anderen könnte die Klärung der genetischen Ursachen für das KRK eine individuelle Risikoeinschätzung möglich machen, die zu einem individuellen Vorsorgeplan führen könnte. Gleichzeitig könnte sich daraus als Nebeneffekt die Möglichkeit ergeben, neue Heilverfahren und effektivere Chemotherapien zu erschließen. Aufgabe ist es, alle relevanten Gene zu

identifizieren und zusätzlich die Art und den Schweregrad ihrer Einflussnahme auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms in der Bevölkerung zu erkennen.

Da jede Genvariante wahrscheinlich nur einen kleinen Beitrag zu einer komplexen Erkrankung leistet, stellt eine Identifikation dieser Gene eine gewisse Schwierigkeit dar. Kandidatengen-Studien sind in ihrer Fähigkeit, diese Prädispositionen aufzudecken, dadurch begrenzt, dass immer nur eine kleine Zahl von Genvarianten untersucht werden kann. Genomweite Assoziationsstudien mit Hilfe von DNA-Chips bieten hierzu neue Lösungsansätze (Hirschhorn und Daly 2005). In England konnte das „Wellcome-Trust-Case-Control-Consortium“ bereits im Jahr 2007 unter Verwendung des Affymetrix-GeneChip-500K bisher unbekannte Assoziationen zahlreicher Genvarianten zu verbreiteten Krankheiten, wie zum Beispiel dem Diabetes mellitus, der koronaren Herzkrankheit oder dem Morbus Crohn, aufdecken (Consortium 2007).

Auch bei der Suche nach Suszeptibilitätsfaktoren für das KRK wurden mit Hilfe genomweiter Assoziationsstudien bereits Erfolge verbucht. Vorher unbekannte Risikovarianten für das KRK konnten in mehreren Studien an unterschiedlichen Populationen auf den Genabschnitten 8q23.3, 8q24.21, 10p14, 11q23, 15q13 und 18q21 identifiziert werden (Broderick et al. 2007; Tomlinson et al. 2007; Zanke et al. 2007; Houlston et al. 2008; Tenesa et al. 2008; Tomlinson et al. 2008). Diese genomweiten Studien zeigen alle keinen Zusammenhang zwischen *CARD8* und dem KRK. Dies ist eine wichtige Bestätigung der Ergebnisse der hier vorliegenden Studie, die ebenfalls keine Assoziation zeigen kann.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Reparaturgene, die beim HNPCC ursächlich sind, nicht ursächlich für ein sporadisches KRK sind. Dies steht im klaren Widerspruch zu der Veröffentlichung von Lipkin et al. in Nature Genetics 2004 (Lipkin et al. 2004; Schafmayer et al. 2007). Die Gene, die mit dem kolorektalen Karzinom assoziiert sind, wie zum Beispiel *SMAD7* und deren molekulare Signalwege ähneln eher der familiären adenomatösen Polyposis mit einer besonderen Relevanz für das TGF-beta und des wnt-Signalwegs (Broderick et al. 2007). Damit könnten sich neue Möglichkeiten für Ansätze einer gezielten molekularen Prävention des KRK ergeben. Allerdings werden weitere genomweite Assoziationsstudien erforderlich sein, um die populationsübergreifenden genetischen und exogenen Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom aufzudecken. Auch der Zusammenhang zwischen den Risikogenen und dem Langzeit Follow-Up des KRK bleibt bis heute unerforscht. Die

von uns erstellte qualitativ und quantitativ hochwertige Kohorte bietet die Möglichkeit, in weiteren Studien zum Einsatz zu kommen und somit wichtige neue Erkenntnisse zum sporadischen kolorektalen Karzinom zu erlangen.

## 5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird auf über 70.000 geschätzt. Neben anderen Risikofaktoren sind 30 % der kolorektalen Karzinome auf vererbte Faktoren zurückzuführen, wobei nur 5 % innerhalb syndromaler Erkrankungen und 25 % als familiäre Häufungen auftreten. Zahlreiche große epidemiologische Studien konnten diese familiäre Häufung des sporadischen KRK replizieren. Die Tatsache, dass Patienten mit einer CED ein erhöhtes Risiko für ein KRK haben und auch hier eine familiäre Häufung anzutreffen ist, impliziert die Vermutung, dass bestimmte Mutationsvarianten von Genen, die am Immunsystem beteiligt sind, Ursache des erhöhten KRK-Risikos sein könnten.

Das Ziel der Untersuchung war es herauszufinden, ob bestimmte Mutationsvarianten des am angeborenen Immunsystem beteiligten Genes, *CARD8*, prädisponierende Faktoren für die Entwicklung eines sporadischen KRK sind.

Die Studie wurde als Fall-Kontroll-Studie konzipiert, wobei die Häufigkeit von Polymorphismen in Patienten und Kontrollen verglichen und die verantwortlichen genetischen Mutationsvarianten durch systematische Kartierung mittels Kopplungsgleichgewicht identifiziert wurden. 1044 Patienten mit operiertem KRK wurden mit 724 gesunden, nach Geschlecht gematchten Kontrollen verglichen. In der Studie wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet. Zum einen wurden *coding*-SNPs und zum anderen *Haplotype-tagging*-SNPs geprüft. Es wurden 13 Marker für das *CARD8*-Gen untersucht.

Im Gegensatz zu anderen Studien konnte keine Assoziation zwischen *CARD8* und dem sporadischen kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden. Es wird damit möglicherweise deutlich, dass innerhalb Europas Bevölkerungsgruppen eine hohe Heterogenität in der Beteiligung der *CARD8*-Mutationsvarianten an dem KRK-Risiko besteht und somit erhebliche Ethnizitätsunterschiede festzustellen sind. Es wird die Aufgabe von genomweiten Assoziationsstudien sein, die populationsübergreifenden genetischen und exogenen Risikofaktoren für das sporadische kolorektale Karzinom aufzudecken.



## 6 Literaturverzeichnis

- Alhopuro, P., T. Ahvenainen, et al. (2004). "NOD2 3020insC alone is not sufficient for colorectal cancer predisposition." Cancer Res **64**(20): 7245-7.
- American\_Gastroenterological\_Association (2000). "American Gastroenterological Association medical position statement: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. American College of Gastroenterology." Gastroenterology **118**(6): 1233-4.
- Andrieu, N., G. Launoy, et al. (2003). "Familial relative risk of colorectal cancer: a population-based study." Eur J Cancer **39**(13): 1904-11.
- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet **357**(9255): 539-45.
- Bender, R. and S. Lange (2001). "Adjusting for multiple testing--when and how?" J Clin Epidemiol **54**(4): 343-9.
- Bingham, S. A., N. E. Day, et al. (2003). "Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study." Lancet **361**(9368): 1496-501.
- Bonelli, L., H. Martines, et al. (1988). "Family history of colorectal cancer as a risk factor for benign and malignant tumours of the large bowel. A case-control study." Int J Cancer **41**(4): 513-7.
- Bouchier-Hayes, L. and S. J. Martin (2004). "CARDINAL roles in apoptosis and NFkappaB activation." Vitam Horm **67**: 133-47.
- Broderick, P., L. Carvajal-Carmona, et al. (2007). "A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk." Nat Genet **39**(11): 1315-7.
- Buch, S., C. Schafmayer, et al. (2007). "A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease." Nat Genet **39**(8): 995-9.
- Burkitt, D. P. (1993). "Epidemiology of cancer of the colon and rectum. 1971." Dis Colon Rectum **36**(11): 1071-82.
- Burt, R. W. (2000). "Colon cancer screening." Gastroenterology **119**(3): 837-53.
- Butterworth, A. S., J. P. Higgins, et al. (2006). "Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis." Eur J Cancer **42**(2): 216-27.
- Calvert, P. M. and H. Frucht (2002). "The genetics of colorectal cancer." Ann Intern Med **137**(7): 603-12.
- Chakravarti, A. (1999). "Population genetics--making sense out of sequence." Nat Genet **21**(1 Suppl): 56-60.
- Cho, E., S. A. Smith-Warner, et al. (2004). "Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies." Ann Intern Med **140**(8): 603-13.
- Cichon, S., F. J., et al. (2002). "Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung." Dtsch Arztebl **99**: 3091-3101.
- Collins, F. S., L. D. Brooks, et al. (1998). "A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation." Genome Res **8**(12): 1229-31.
- Consortium, W. T. C. C. (2007). "Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls." Nature **447**(7145): 661-78.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science **261**(5123): 921-3.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-7.

- Cruz-Bustillo Clarens, D. (2004). "Molecular genetics of colorectal cancer." Rev Esp Enferm Dig **96**(1): 48-59.
- Davidson, N. O. (2007). "Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why." Keio J Med **56**(1): 14-20.
- de Jong, M. M., I. M. Nolte, et al. (2002). "Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(11): 1332-52.
- Dudbridge, F. (2003). "Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes." Genet Epidemiol **25**(2): 115-21.
- Duncan, J. L. and J. Kyle (1982). "Family incidence of carcinoma of the colon and rectum in north-east Scotland." Gut **23**(2): 169-71.
- Engel, J., G. Anker, et al. (2000). "[Population-related findings and treatment results and clinic variations in the Munich field study of rectal carcinoma]." Zentralbl Chir **125**(12): 947-53.
- Erdmann, J., A. Grosshennig, et al. (2009). "New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3." Nat Genet **41**(3): 280-2.
- Farrington, S. M., A. Tenesa, et al. (2005). "Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects." Am J Hum Genet **77**(1): 112-9.
- Fearnhead, N. S., M. P. Britton, et al. (2001). "The ABC of APC." Hum Mol Genet **10**(7): 721-33.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Ferlay, J., P. Autier, et al. (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." Ann Oncol **18**(3): 581-92.
- Fisher, G. and B. Armstrong (1989). "Familial colorectal cancer and the screening of family members." Med J Aust **150**(1): 22-5.
- Franco, A., A. K. Sikalidis, et al. (2005). "Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors." Rev Esp Enferm Dig **97**(6): 432-48.
- Freudenberg, J., S. Cichon, et al. (2002). "Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität." Dtsch Arztebl **99**: 3190-3195.
- Fuchs, C. S., E. L. Giovannucci, et al. (1994). "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer." N Engl J Med **331**(25): 1669-74.
- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109** Suppl: S81-96.
- Goldgar, D. E., D. F. Easton, et al. (1994). "Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands." J Natl Cancer Inst **86**(21): 1600-8.
- Gomaa, A. I., S. A. Khan, et al. (2008). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis." World J Gastroenterol **14**(27): 4300-8.
- Haiman, C. A., L. Le Marchand, et al. (2007). "A common genetic risk factor for colorectal and prostate cancer." Nat Genet **39**(8): 954-6.
- Hamilton, S. R., B. Liu, et al. (1995). "The molecular basis of Turcot's syndrome." N Engl J Med **332**(13): 839-47.
- Hampe, J., A. Cuthbert, et al. (2001). "Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations." Lancet **357**(9272): 1925-8.
- Hemminki, K. and B. Chen (2004). "Familial risk for colorectal cancers are mainly due to heritable causes." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(7): 1253-6.
- Hirschhorn, J. N. and M. J. Daly (2005). "Genome-wide association studies for common diseases and complex traits." Nat Rev Genet **6**(2): 95-108.
- Horikawa, Y., N. Oda, et al. (2000). "Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus." Nat Genet **26**(2): 163-75.

- Houlston, R. S. and I. P. Tomlinson (2001). "Polymorphisms and colorectal tumor risk." Gastroenterology **121**(2): 282-301.
- Houlston, R. S., E. Webb, et al. (2008). "Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer." Nat Genet **40**(12): 1426-35.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, et al. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.
- Itzkowitz, S. H. and X. Yio (2004). "Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(1): G7-17.
- Jenne, D. E., H. Reimann, et al. (1998). "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase." Nat Genet **18**(1): 38-43.
- Johns, L. E., F. Kee, et al. (2002). "Colorectal cancer mortality in first-degree relatives of early-onset colorectal cancer cases." Dis Colon Rectum **45**(5): 681-6.
- Kamangar, F., G. M. Dores, et al. (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." J Clin Oncol **24**(14): 2137-50.
- Karin, M. and F. R. Greten (2005). "NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." Nat Rev Immunol **5**(10): 749-59.
- Kathiresan, S., B. F. Voight, et al. (2009). "Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants." Nat Genet **41**(3): 334-41.
- Kemp, Z., C. Thirlwell, et al. (2004). "An update on the genetics of colorectal cancer." Hum Mol Genet **13 Spec No 2**: R177-85.
- Krawczak, M., S. Nikolaus, et al. (2006). "PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships." Community Genet **9**(1): 55-61.
- Kune, G. A., S. Kune, et al. (1989). "The role of heredity in the etiology of large bowel cancer: data from the Melbourne Colorectal Cancer Study." World J Surg **13**(1): 124-9; discussion 129-31.
- Kurzwaski, G., J. Suchy, et al. (2004). "The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer." Cancer Res **64**(5): 1604-6.
- Lakatos, P. L., E. Hitre, et al. (2007). "Common NOD2/CARD15 variants are not associated with susceptibility or the clinicopathologic characteristics of sporadic colorectal cancer in Hungarian patients." BMC Cancer **7**: 54.
- Laken, S. J., G. M. Petersen, et al. (1997). "Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC." Nat Genet **17**(1): 79-83.
- Lander, E. S. and N. J. Schork (1994). "Genetic dissection of complex traits." Science **265**(5181): 2037-48.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, et al. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med **343**(2): 78-85.
- Lipkin, S. M., L. S. Rozek, et al. (2004). "The MLH1 D132H variant is associated with susceptibility to sporadic colorectal cancer." Nat Genet **36**(7): 694-9.
- Locker, G. Y., K. Kaul, et al. (2006). "The I1307K APC polymorphism in Ashkenazi Jews with colorectal cancer: clinical and pathologic features." Cancer Genet Cytogenet **169**(1): 33-8.
- Lovett, E. (1976). "Family studies in cancer of the colon and rectum." Br J Surg **63**(1): 13-18.
- Lynch, H. T. and J. F. Lynch (1998). "Genetics of colonic cancer." Digestion **59**(5): 481-92.

- Macarthur, M., G. L. Hold, et al. (2004). "Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **286**(4): G515-20.
- Macklin, M. T. (1960). "Inheritance of cancer of the stomach and large intestine in man." J Natl Cancer Inst **24**: 551-71.
- Maire, P., M. Morichau-Beauchant, et al. (1984). "[Familial occurrence of cancer of the colon and the rectum: results of a 3-year case-control survey]." Gastroenterol Clin Biol **8**(1): 22-7.
- Michor, F., Y. Iwasa, et al. (2005). "Dynamics of colorectal cancer." Semin Cancer Biol **15**(6): 484-93.
- Michor, F., Y. Iwasa, et al. (2004). "Linear model of colon cancer initiation." Cell Cycle **3**(3): 358-62.
- Naccarati, A., B. Pardini, et al. (2007). "Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms." Mutat Res **635**(2-3): 118-45.
- Narod, S. A., O. Ginsburg, et al. (1995). "Family history and colorectal cancer." N Engl J Med **332**(23): 1578; author reply 1579.
- Nothnagel, M. and K. Rohde (2005). "The effect of single-nucleotide polymorphism marker selection on patterns of haplotype blocks and haplotype frequency estimates." Am J Hum Genet **77**(6): 988-98.
- Ott, J. (1974). "Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies." Am J Hum Genet **26**(5): 588-97.
- Papaconstantinou, I., G. Theodoropoulos, et al. (2005). "Association between mutations in the CARD15/NOD2 gene and colorectal cancer in a Greek population." Int J Cancer **114**(3): 433-5.
- Pathan, N., H. Marusawa, et al. (2001). "TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer." J Biol Chem **276**(34): 32220-9.
- Ponz de Leon, M., A. Antonioli, et al. (1987). "Incidence and familial occurrence of colorectal cancer and polyps in a health-care district of northern Italy." Cancer **60**(11): 2848-59.
- Potter, J. D. (1999). "Colorectal cancer: molecules and populations." J Natl Cancer Inst **91**(11): 916-32.
- Powell, S. M., N. Zilz, et al. (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature **359**(6392): 235-7.
- Propping, P. (2004). "Genetische Diagnostik vor dem Hintergrund von Millionen Polymorphismen." Dtsch Arztebl **101**: 3100-3101.
- Razmara, M., S. M. Srinivasula, et al. (2002). "CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis." J Biol Chem **277**(16): 13952-8.
- RKI, G. d. e. K. i. D. e. V. u. d. (2006). Krebs in Deutschland, 5. überarbeitete aktualisierte Auflage, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken.
- Roberts, R. L., R. B. Gearry, et al. (2006). "Caspase recruitment domain-containing protein 15 mutations in patients with colorectal cancer." Cancer Res **66**(5): 2532-5.
- Rodriguez-Bigas, M. A., C. R. Boland, et al. (1997). "A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines." J Natl Cancer Inst **89**(23): 1758-62.
- Roses, A. D. (1997). "A model for susceptibility polymorphisms for complex diseases: apolipoprotein E and Alzheimer disease." Neurogenetics **1**(1): 3-11.

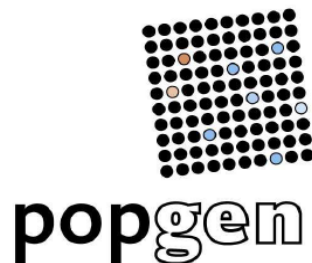
- Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, et al. (1986). "Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location." Nature **322**(6074): 32-8.
- Schafmayer, C., S. Buch, et al. (2007). "Genetic investigation of DNA-repair pathway genes PMS2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, OGG1 and MTH1 in sporadic colon cancer." Int J Cancer **121**(3): 555-8.
- Schmiegel, W., C. Pox, et al. (2004). "[S3-Guidelines Conference "Colorectal Carcinoma" 2004]." Z Gastroenterol **42**(10): 1129-77.
- Sondergaard, J. O., S. Bulow, et al. (1991). "Cancer incidence among parents of patients with colorectal cancer." Int J Cancer **47**(2): 202-6.
- St John, D. J., F. T. McDermott, et al. (1993). "Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer." Ann Intern Med **118**(10): 785-90.
- Stephenson, B. M., P. J. Finan, et al. (1991). "Frequency of familial colorectal cancer." Br J Surg **78**(10): 1162-6.
- Su, L. K., B. Vogelstein, et al. (1993). "Association of the APC tumor suppressor protein with catenins." Science **262**(5140): 1734-7.
- Tenesa, A., S. M. Farrington, et al. (2008). "Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21." Nat Genet **40**(5): 631-7.
- Tomlinson, I., E. Webb, et al. (2007). "A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21." Nat Genet **39**(8): 984-8.
- Tomlinson, I. P., E. Webb, et al. (2008). "A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3." Nat Genet **40**(5): 623-30.
- Tregouet, D. A., I. R. Konig, et al. (2009). "Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease." Nat Genet **41**(3): 283-5.
- Tuupanen, S., P. Alhopuro, et al. (2007). "No evidence for association of NOD2 R702W and G908R with colorectal cancer." Int J Cancer **121**(1): 76-9.
- Vasen, H. F., J. P. Mecklin, et al. (1991). "The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)." Dis Colon Rectum **34**(5): 424-5.
- Verla-Tebit, E., C. Lilla, et al. (2006). "Cigarette smoking and colorectal cancer risk in Germany: a population-based case-control study." Int J Cancer **119**(3): 630-5.
- Vogelstein B, K. K. (2002). The genetic basis of human cancer. New York, McGraw-Hill.
- Wajant, H. (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." Science **296**(5573): 1635-6.
- Wheeler, D. L., T. Barrett, et al. (2008). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D13-21.
- Woolf, C. M. (1958). "A genetic study of carcinoma of the large intestine." Am J Hum Genet **10**(1): 42-7.
- Zanke, B. W., C. M. Greenwood, et al. (2007). "Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24." Nat Genet **39**(8): 989-94.
- Zhao, H., R. Pfeiffer, et al. (2003). "Haplotype analysis in population genetics and association studies." Pharmacogenomics **4**(2): 171-8.
- Ziegler, A. (2002). "Genetische Epidemiologie – Gegenwart und Zukunft." Dtsch Arztebl **99**(2342–2346).
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-50.

## 7 Anhang

### 7.1 Fragebogen der Kolonkarzinompatienten

#### **Fragebogen zur Schleswig- Holsteinischen Studie „Gesundheit für Generationen“**

#### **Genetische Ursachen des Dickdarmkrebses**



**Herzlich willkommen!** Wir freuen uns darüber, dass Sie an unserer Studie teilnehmen. Die Antworten zu folgenden Fragen werden von uns ohne Ihre persönlichen Daten ausgewertet. Zu Beginn haben wir einige allgemeine Fragen zu Ihrer Person und Ihrer Herkunft, bzw. der Herkunft Ihrer Eltern.

1)	Heutiges Datum	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	
		Tag	Monat	Jahr	
2)	Geschlecht	<input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich			
3)	Geburtsdatum	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	
		Tag	Monat	Jahr	
4)	Körpergröße (cm):	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>			
	Gewicht (kg):	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>			
5)	Sind Sie in Deutschland geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Sind Sie in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Sind Sie in Kiel geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land sind Sie dann geboren? Land: _____				
6)	Ist Ihr Vater in Deutschland geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Ist Ihr Vater in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Ist Ihr Vater in Kiel geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihr Vater dann geboren? Land: _____				
7)	Ist Ihre Mutter in Deutschland geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Ist Ihre Mutter in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Ist Ihre Mutter in Kiel geboren? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</span> Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihre Mutter dann geboren? Land: _____				
8)	Haben Sie Kinder? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wie viele? Anzahl: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>				

9) Haben Sie Geschwister?

☐ nein

☐ ja

Wenn ja, wie viele?

Anzahl:

10) Hat Ihr Vater Geschwister?

☐ nein

☐ ja

Wenn ja, wie viele?

Anzahl:

11) Hat Ihre Mutter Geschwister?

☐ nein

☐ ja

Wenn ja, wie viele?

Anzahl:

12) Wie schätzen Sie Ihre gegenwärtige körperliche Verfassung ein?

☐ sehr gut

☐ gut

☐ weniger gut

☐ schlecht

13) Falls Sie gesundheitliche Beschwerden haben, welche sind das?

14) Haben oder hatten Sie jemals in Ihrem Leben eine andere schwere Erkrankung als Dickdarmkrebs?

☐ nein

☐ ja

Wenn ja, welche? \_\_\_\_\_

*Im Folgenden werden Sie zum Dickdarmkrebs befragt:*

15) Wann wurde bei Ihnen der Dickdarmkrebs festgestellt?

Jahr:     oder damaliges Alter:



16)	Wo trat die Krebserkrankung auf? <input type="checkbox"/> Enddarm (Rektum) <input type="checkbox"/> übriger Dickdarm Wissen Sie es noch genauer? <input type="checkbox"/> rechter Dickdarm <input type="checkbox"/> Querkolon <input type="checkbox"/> linker Dickdarm								
17)	Wurden Sie operiert? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>  <i>Falls Sie die Genehmigung zur Untersuchung des Tumorgewebes erteilen (siehe Einwilligungserklärung), bitten wir Sie hier Namen und Ort des Krankenhauses, in dem der Eingriff vorgenommen wurde, anzugeben.</i> <i>Name und Ort des Krankenhauses, in dem der Eingriff vorgenommen wurde:</i>  .....								
18)	Hat / hatte der Tumor bereits gestreut (Metastasen gesetzt)? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja: Leber <input type="checkbox"/> ja: im Bauch <input type="checkbox"/> ja: andere Organe								
19)	Haben / hatten Sie neben dem Dickdarmkrebs noch andere Krebserkrankungen? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, um welche handelt es sich? <table><tr><td><input type="checkbox"/> Brustkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Gebärmutterkrebs</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> Blasenkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Leberkrebs</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> Dünndarmkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Magenkrebs</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> Eierstockkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____</td></tr></table> _____	<input type="checkbox"/> Brustkrebs	<input type="checkbox"/> Gebärmutterkrebs	<input type="checkbox"/> Blasenkrebs	<input type="checkbox"/> Leberkrebs	<input type="checkbox"/> Dünndarmkrebs	<input type="checkbox"/> Magenkrebs	<input type="checkbox"/> Eierstockkrebs	<input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____
<input type="checkbox"/> Brustkrebs	<input type="checkbox"/> Gebärmutterkrebs								
<input type="checkbox"/> Blasenkrebs	<input type="checkbox"/> Leberkrebs								
<input type="checkbox"/> Dünndarmkrebs	<input type="checkbox"/> Magenkrebs								
<input type="checkbox"/> Eierstockkrebs	<input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____								

*Die erbliche Veranlagung für Krebserkrankungen ist für uns besonders wichtig. Deshalb befragen wir Sie im folgenden zu Krebserkrankungen, die in Ihrer Familie auftraten.*

20) Wissen Sie von Blutsverwandten, die Krebserkrankungen haben / hatten?

☐ nein

☐ ja

*Beachten Sie bitte besonders die folgende Tabelle.*

- 21) Bitte kreuzen Sie in der folgenden Tabelle an (☒), wieviele Geschwister und / oder Kinder Sie haben und welche davon verstorben sind. Geben Sie das jetzige Alter, bzw. das Alter zum Todeszeitpunkt an. Kreuzen Sie bitte auch an, welche Krankheiten Ihr Verwandter bzw. Ihre Verwandten haben / hatten und geben Sie das (ungefähre) Alter an, in dem die Krebserkrankung auftrat. **Auch wenn keiner Ihrer Familienangehörigen an Krebs erkrankt ist, füllen Sie bitte die ersten drei Spalten der Tabelle aus.**

Familien-angehörige/r	Haben / hatten Sie ...	verstorben	jetziges Alter bzw. Alter zum Todeszeitpunkt	Dickdarmkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Brustkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Blasenkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Eierstockkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Gebärmutter-krebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Leberkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Magenkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	sonstige:	Alter bei Krankheitsbeginn
(Lebens-) Ehepartner																			
Mutter	☒																		
Vater	☒																		
Schwester 1																			
Schwester 2																			
Schwester 3																			
Bruder 1																			
Bruder 2																			
Bruder 3																			
Tochter 1																			
Tochter 2																			
Tochter 3																			
Sohn 1																			
Sohn 2																			
Sohn 3																			
andere:																			

*Bei bestimmten Erkrankungen tritt gehäuft Darmkrebs auf, deshalb möchten wir Sie fragen:*

22)	Leiden Sie an Morbus Crohn? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>
23)	Leiden Sie an Colitis ulcerosa? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>
24)	Leiden Sie an einer anderen entzündlichen Darmerkrankung? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, an welcher? _____ Wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>

*Die nächsten Fragen beschäftigen sich mit Genussmitteln:*

25)	Wieviel Alkohol trinken Sie ungefähr pro Tag? <input type="checkbox"/> keinen <input type="checkbox"/> weniger als eine Flasche Bier (1-2 Glas Wein oder Schnaps) <input type="checkbox"/> etwa eine Flasche Bier (1-2 Glas Wein oder Schnaps) <input type="checkbox"/> mehr als eine Flasche Bier (1-2 Glas Wein oder Schnaps)
26)	Haben Sie in Ihrem Leben über einen längeren Zeitraum (mehr als 2 Jahre) mindestens 5 Zigaretten pro Tag geraucht? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja

**Herzlichen Dank für Ihre Mitwirkung!**

*Bitte beachten Sie die nächste Seite.*

*Wir haben noch einige abschließende Fragen an Sie:*

*Wir können Ihnen leider keine persönlichen Untersuchungsergebnisse der genetischen Analysen mitteilen. Aufgrund vieler Rückfragen von Patienten führen wir jedoch eine separate Adressendatei für die Zusendung **allgemeiner** Informationen zum Fortgang des Projektes.*

Möchten Sie weiter über die allgemeinen Ergebnisse der Studie auf dem Laufenden gehalten werden? Wenn ja, werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse aufbewahren, um Sie über die neuesten Fortschritte zu informieren. Diese Daten werden natürlich getrennt von Ihren persönlichen Untersuchungsdaten gespeichert.

- ☐ ja, ich möchte weiter informiert werden
- ☐ ja, ich möchte per E-Mail informiert werden: \_\_\_\_\_
- ☐ nein, ich möchte nicht weiter informiert werden

*In Zukunft werden Folgestudien zu dieser Untersuchung durchgeführt. Wir würden uns freuen, wenn auch Sie wieder daran teilnehmen. In diesem Fall werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse getrennt von Ihren Studiendaten für eine erneute Kontaktaufnahme zu Beginn der Folgestudie speichern.*

Sind Sie bereit, an einer Folgestudie teilzunehmen?

- ☐ ja
- ☐ nein

*Haben Sie Fragen, wenden Sie sich bitte an das **popgen**-Team (Tel.: 0431/597-3710). Sie können uns auch eine E-mail schicken: [info@popgen.de](mailto:info@popgen.de)*

**Nochmals vielen Dank! Und alles Gute für Sie!**

Ihr  **popgen** Forschungsteam

## 7.2 Einverständniserklärung und Merkblatt

UK  
SH

«first\_name» «last\_name»  
«street»

«postal\_code» «city»



UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
Schleswig-Holstein



Campus Kiel  
1. Medizinische Klinik  
Forschungsprojekt popgen  
Schittenhelmstr. 12  
24105 Kiel

### POPGEN- STUDIE: GENETISCHE URSACHEN DES DICKDARMKREBSSES

#### EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

- ☐ Ich willige in die Entnahme von 30 ml Blut und die Speicherung der in diesem Zusammenhang gewonnenen Daten ein. Das Eigentum an diesem Material geht damit an das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein über.

Ich hatte ausreichend Zeit und Gelegenheit zur Entscheidung. Mir ist bekannt, dass durch eine Nicht-Teilnahme keinerlei Nachteile für mich entstehen können.

- ☐ Ich erteile die Genehmigung zur Einsicht in vorhandene Patientenunterlagen «clinic» bei durch den/die verantwortliche Studienarzt/-ärztin.
- ☐ Ich erteile die Genehmigung zur Anforderung einer Tumorprobe für zusätzliche histologische Untersuchungen.

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung jederzeit widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Eventuelle zusätzliche Fragen sind mir ausreichend beantwortet worden, denn ich hatte die Gelegenheit, mit einem/r Arzt/Ärztin alle wichtigen Fragen zu diskutieren.

....., den ..... 2007

Unterschrift: .....

Merkblatt zur Einwilligungserklärung siehe Rückseite

### Merkblatt zur Einwilligungserklärung

Wir führen an der Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein in Kiel das Forschungsvorhaben **popgen** zur genetischen Veranlagung von weit verbreiteten Krankheiten durch. Untersucht werden dabei *chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Reizdarm, Darmkrebs, Gallensteine, Erkrankungen der Herzkranzgefäße (KHK), entzündliche Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates und einige neurologische Erkrankungen wie Krampfleiden und Morbus Parkinson (Schüttellähmung)*. Um unsere Forschungserkenntnisse überprüfen zu können, bitten wir Sie um die Einwilligung, Ihnen

☒ **30 ml peripher venöses Blut**

entnehmen zu dürfen und die daran gewonnen genetischen Daten ebenso wie Ihre zusätzlichen Angaben auf dem beiliegenden Fragebogen ausschließlich zu den oben genannten Forschungszwecken zu speichern. Wir beabsichtigen, aus Ihrem Blut DNA (Erbsubstanz) zu gewinnen, um die genetische Veranlagung zu einer der oben genannten Erkrankungen zu überprüfen. Die dafür verantwortlichen Gene können sich überall im gesamten Erbgut befinden. Es werden jedoch nur die jeweils als relevant bekannten Gene untersucht.

#### Risiken der Blutentnahme:

Wie zu einer Routineblutentnahme werden Ihnen unter sterilen Bedingungen 30 ml Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Dazu ist die Punktion einer Vene notwendig. Die Risiken einer Blutentnahme sind: Lokale Infektion ("bakterielle Entzündung, Vereiterung"), Fehlpunktion der Vene und anschließende Ausbildung eines Blutergusses (Hämatom), sehr selten Fehlpunktion einer Schlagader, Schädigung eines Hautnervs mit der möglichen Folge dauerhafter Schmerzen und/oder bleibenden Funktionseinschränkungen). Alle oben genannten Risiken sind bei sachgemäßer Durchführung extrem selten.

#### Speicherung von Daten:

Ihre persönlichen Daten (Name, Vorname, Adresse, Geburtsdatum) werden getrennt von den Probanden gespeichert. Die Proben werden durch eine fortlaufende Strichkodierung pseudonymisiert. Die mit der Probe verbundenen Informationen (d.h. Angaben aus dem Fragebogen, Genotypen) sind nur über diese Kodierung abrufbar. Zur Qualitätskontrolle unserer Daten bitten wir Sie um die Genehmigung, vorhandene Patientenunterlagen einsehen zu dürfen. Für diese spezielle Situation entbinden Sie den behandelnden Arzt von der Schweigepflicht gegenüber verantwortlichen ärztlichen Mitarbeitern des Forschungsvorhabens.

Auf die Daten haben nur autorisierte Mitarbeiter des Forschungsprojektes Zugriff. Da das Projekt unter ärztlicher Leitung steht, unterliegen alle Mitarbeiter der ärztlichen Schweigepflicht. Eine Weitergabe Ihrer Daten an unberechtigte Dritte (insbesondere Arbeitgeber, Versicherungen) ist ausgeschlossen. Die Weitergabe von Proben und Informationen an wissenschaftliche Kooperationspartner erfolgt ohne Angaben zu Ihrer Person. Bei Beendigung der Forschungsaktivitäten (frühestens nach 20 Jahren) werden die Proben und die dazu gehörenden Daten vernichtet. Das Konzept zur Sammlung und Speicherung aller Daten wurde vom Unabhängigen Landeszentrum für Datenschutz und der Ethikkommission der Universitätsklinikums Schleswig- Holstein geprüft.

Die Herausgabe einzelner persönlicher Untersuchungsergebnisse ist aus forschungsmethodischen Gründen nicht möglich. Durch diese Untersuchungen wird eine Vielzahl von genetischen Merkmalen getestet werden. Es ist der Zweck der Untersuchung, eine Risikoabschätzung für bestimmte genetische Erkrankungen in der „Durchschnittsbevölkerung“ zu erstellen. Dieses schließt eine persönliche Risikobewertung nicht ein. Es ist daher nicht zu erwarten, dass sich durch die Untersuchungen persönlichkeitsrelevante Erkenntnisse ergeben. Auf Ihren Wunsch informieren wir Sie gerne über den allgemeinen Fortgang des Forschungsprojektes. In diesem Fall würden wir Ihren Namen, Ihren Vornamen und Ihre Adresse gemäß den datenschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Schleswig Holstein in einer gesonderten Adressdatei speichern, um Ihnen einen Projektbericht zusenden zu können.

#### Patentrechte

Es kann sein, dass im Rahmen zukünftiger Forschungsergebnisse Patente entstehen, die auf Erkenntnissen basieren, die aus Ihren Proben gewonnen wurden. Solche Patente sind die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente. In diesem Fall besteht kein individueller Patentanspruch, basierend auf Ihrem individuellen biologischen oder genetischen Material.

#### Widerruf

Die Teilnahme an diesen wissenschaftlichen Untersuchungen ist absolut freiwillig. Solange Ihre persönlichen Daten nicht gelöscht sind, kann Ihre Zustimmung jederzeit widerrufen werden. Daraus entstehen Ihnen keinerlei Nachteile. Gegebenenfalls bereits entnommene Proben werden dann unverzüglich vernichtet, und Ihre Daten werden umgehend gelöscht. Einen etwaigen Widerruf Ihrer Zustimmung richten Sie bitte schriftlich an die Projektleitung **popgen**, 1. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel, Schittenhelmstr. 12, D- 24105 Kiel.

#### Weitere Fragen

Wünschen Sie ein weitergehendes, ausführliches Arztgespräch, so vereinbaren Sie bitte einen Termin unter 0431/597-3710.

#### Verantwortliche ärztliche Leitung

PD Dr. med. Susanna Nikolaus

#### Studienarzt

PD Dr. med. Jochen Hampe

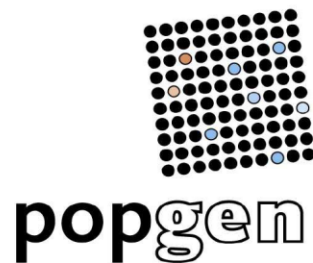
#### Projektleitung

Dipl. soz. Huberta von Eberstein

### **7.3 Fragebogen der Kontrollgruppe**

#### **Fragebogen zur Schleswig- Holsteinischen Studie „Gesundheit für Generationen“**

#### **Genetische Ursachen des Dickdarmkrebses - Kontrollgruppe -**





**Herzlich willkommen!** Wir freuen uns darüber, dass Sie an unserer Studie teilnehmen. Die Antworten zu folgenden Fragen werden von uns ohne Ihre persönlichen Daten ausgewertet. Zu Beginn haben wir einige allgemeine Fragen zu Ihrer Person und Ihrer Herkunft, bzw. der Herkunft Ihrer Eltern:

1)	Heutiges Datum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
		Tag	Monat	Jahr
2)	Geschlecht	<input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich		
3)	Geburtsdatum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
		Tag	Monat	Jahr
4)	Körpergröße (cm):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		
	Gewicht (kg):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		
5)	Sind Sie in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Sind Sie in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Sind Sie in Kiel geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land sind Sie dann geboren?	Land: _____		
6)	Ist Ihr Vater in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Ist Ihr Vater in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Ist Ihr Vater in Kiel geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihr Vater dann geboren?	Land: _____		
7)	Ist Ihre Mutter in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Ist Ihre Mutter in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Ist Ihre Mutter in Kiel geboren?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihre Mutter dann geboren?	Land: _____		
8)	Haben Sie Kinder?	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wie viele? Anzahl: <input type="text"/> <input type="text"/>		

9) Haben Sie Geschwister?  <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wie viele? Anzahl: <input type="text"/> <input type="text"/>								
10) Wie schätzen Sie Ihre gegenwärtige körperliche Verfassung ein?  <input type="checkbox"/> sehr gut <input type="checkbox"/> gut <input type="checkbox"/> weniger gut <input type="checkbox"/> schlecht								
11) Falls Sie gesundheitliche Beschwerden haben, welche sind das?								
12) Haben / hatten Sie jemals in Ihrem Leben eine schwere Erkrankung (außer einer Krebserkrankung)?  <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, welche? _____								
13) Haben / hatten Sie jemals eine Krebserkrankung?  <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, um welche handelt es sich? <table><tr><td><input type="checkbox"/> Brustkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Gebärmutterkrebs</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> Blasenkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Leberkrebs</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> Dünndarmkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Magenkrebs</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> Eierstockkrebs</td><td><input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____</td></tr></table>	<input type="checkbox"/> Brustkrebs	<input type="checkbox"/> Gebärmutterkrebs	<input type="checkbox"/> Blasenkrebs	<input type="checkbox"/> Leberkrebs	<input type="checkbox"/> Dünndarmkrebs	<input type="checkbox"/> Magenkrebs	<input type="checkbox"/> Eierstockkrebs	<input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____
<input type="checkbox"/> Brustkrebs	<input type="checkbox"/> Gebärmutterkrebs							
<input type="checkbox"/> Blasenkrebs	<input type="checkbox"/> Leberkrebs							
<input type="checkbox"/> Dünndarmkrebs	<input type="checkbox"/> Magenkrebs							
<input type="checkbox"/> Eierstockkrebs	<input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____							
14) Wissen Sie von Blutsverwandten, die Krebserkrankungen haben / hatten?  <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja								

Beachten Sie bitte besonders die folgende Tabelle.

- 15) Die erbliche Veranlagung für Krebserkrankungen ist für uns besonders wichtig. Bitte kreuzen Sie in der folgenden Tabelle an (✗), wieviele Geschwister und / oder Kinder Sie haben und welche davon verstorben sind. Geben Sie das jetzige Alter an, bzw. das Alter zum Todeszeitpunkt. Kreuzen Sie bitte auch an, welche Krankheiten Ihr Verwandter bzw. Ihre Verwandten haben / hatten und geben Sie das (ungefähre) Alter an, in dem die Krebserkrankung auftrat. **Auch wenn keiner Ihrer Familienangehörigen an Krebs erkrankt ist, füllen Sie bitte die ersten drei Spalten der Tabelle aus.**

Familien-angehörige/r	Haben / hatten Sie ...	verstorben	jetziges Alter bzw. Alter zum Todeszeitpunkt	Dickdarmkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Brustkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Blasenkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Dünndarmkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Eierstockkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Gebärmutter-krebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Leberkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	Magenkrebs	Alter bei Krankheitsbeginn	sonstige:	Alter bei Krankheitsbeginn	Alter bei Krankheitsbeginn
(Lebens-) Ehepartner																						
Mutter	✗																					
Vater	✗																					
Schwester 1																						
Schwester 2																						
Schwester 3																						
Bruder 1																						
Bruder 2																						
Bruder 3																						
Tochter 1																						
Tochter 2																						
Tochter 3																						
Sohn 1																						
Sohn 2																						
Sohn 3																						
andere:																						

*Im Folgenden werden Sie zu bestimmten Darmerkrankungen befragt:*

16)	Leiden Sie an Morbus Crohn? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>
17)	Leiden Sie an Colitis ulcerosa? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>
18)	Leiden Sie an einer anderen entzündlichen Darmerkrankung? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, an welcher? _____ Wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>

*Die nächste Frage beschäftigt sich mit Genussmitteln:*

18)	Haben Sie in Ihrem Leben über einen längeren Zeitraum (mehr als 2 Jahre) mindestens 5 Zigaretten pro Tag geraucht? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja
-----	--

**Herzlichen Dank für Ihre Mitwirkung!**

*Bitte beachten Sie die nächste Seite.*

*Wir haben noch einige abschließende Fragen an Sie:*

*Wir können Ihnen leider keine persönlichen Untersuchungsergebnisse mitteilen. Aufgrund vieler Rückfragen von Patienten führen wir jedoch eine separate Adressendatei für die Zusendung **allgemeiner** Informationen zum Fortgang des Projektes.*

Möchten Sie weiter über die allgemeinen Ergebnisse der Studie auf dem Laufenden gehalten werden? Wenn ja, werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse aufbewahren, um Sie über die neuesten Fortschritte zu informieren. Diese Daten werden natürlich getrennt von Ihren persönlichen Untersuchungsdaten gespeichert.

- ☐ ja, ich möchte weiter informiert werden
- ☐ nein, ich möchte nicht weiter informiert werden

Wünschen Sie die Zusendung per E-Mail, geben Sie bitte Ihre E-Mail-Adresse an:

\_\_\_\_\_

*Haben Sie Fragen, wenden Sie sich bitte an das **popgen**-Team (Tel.: 0431/597-3710). Sie können uns auch eine E-mail schicken: [info@popgen.de](mailto:info@popgen.de)*

**Nochmals vielen Dank! Und alles Gute für Sie!**



Ihr **popgen** Forschungsteam

## Danksagung

Diese Arbeit konnte nur durch die Mithilfe vieler Menschen entstehen, bei denen ich mich sehr herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle steht mein Doktorvater, PD Dr. Clemens Schafmayer MBA, der mir das Thema dieser Arbeit überlassen hat. Ein solcher Doktorvater ist ein wahrer Glücksgriff. Bei allen Fragen konnte ich mich an ihn wenden und bekam innerhalb kürzester Zeit Rückmeldung. Für all die Unterstützung, die Förderung und auch den Ansporn möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ebenso wichtig für meine Arbeit ist PD Dr. Jochen Hampe. Als meinem „Zweitdoktorvater“ und Kopf der Forschungsgruppe gebührt auch ihm mein ganz besonderer Dank.

Aber auch allen anderen Mitarbeitern der Forschungsgruppe möchte ich für die Hilfe bei der Rekrutierungsarbeit oder bei der Laborarbeit danken. Dabei sind Dr. Stephan Buch, der immer für alle Fragen offen war und Huberta von Eller-Eberstein und ihr Team der POPGEN Biodatenbank hervorzuheben.

Für die Mithilfe aller Patienten, deren Familien und für die Mitarbeit aller beteiligten Ärzte, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ohne die Hilfe der Chefärzte der teilnehmenden chirurgischen Kliniken wäre eine so hohe Zahl an Patienten nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank für die tatkräftige Unterstützung und die Begeisterung, die Sie unserem Projekt entgegengebracht haben.

Und ganz besonders danke ich Prof. Dr. D.-C. Bröring für die Möglichkeit die Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Ich möchte mich aber auch bei meinen Eltern bedanken, die meine gesamte Karriere ermöglicht, die mich immer unterstützt haben und mir immer den Mut gegeben haben meine Forschung voranzutreiben.

# Curriculum Vitae

**Witigo von Schönfels**, geboren am 01.12.1982 in Münster

Stromeyerstraße 9  
24116 Kiel  
Telefon: 0177-7319001  
Email: schoenfels@googlemail.com

## Schulbildung

06/2002                      Abitur am Gymnasium Paulinum Münster

## Hochschulstudium

10/2002- 03/2004    Nutzung der Wartezeit auf einen Medizinstudienplatz mit Besuch von verschiedenen Vorlesungen in Chemie, Rechtswissenschaften und Medizin an der Ruprecht-Karl Universität in Heidelberg.

04/2004- 03/2006    Physikum der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen.

04/2006- 02/2009    Klinischer Studienabschnitt an der Christian-Albrechts-Universität Kiel

02/2009- Heute      Praktisches Jahr in Santiago/ Chile (Innere Medizin), Flensburg (Urologie) und Kiel (Chirurgie)

## Wissenschaftliche Arbeiten

01/ 2009              Investigation of the colorectal cancer susceptibility region on chromosome 8q24.21 in a large German case-control sample Int J Cancer. 2009 Jan 1;124(1):75-80

10/ 2009              Investigation of innate immunity genes CARD4, CARD8 and CARD15 as germline susceptibility factors for colorectal cancer. BMC Gastroenterol. 2009 Oct 20;9:79.

12/ 2009              Posterveröffentlichung auf dem Nordwestdeutschen Chirurgenkongress in Hamburg: Neuentdeckung und Bestätigung von Risikogenen für das Kolorektale Karzinom